

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG
DES AZADIRACTINS AUF DIE ENTWICKLUNG
UND IHRE STEUERUNG BEI LOCUSTA MIGRATORIA**

Klaus-Peter Sieber

1982
—

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG DES AZADIRACHTINS
AUF DIE ENTWICKLUNG UND IHRE STEUERUNG BEI
LOCUSTA MIGRATORIA

DISSERTATION
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Klaus-Peter Sieber
aus Backnang

1. Juli 1982

UNIVERSITÄT LEIDEN
FACULTÉIT DER RECHTEN
DIEZELNDE AFD. 11

VERBODEN TOEGANG

1982

VERBODEN TOEGANG



Berichterstatte: Priv. Doz. Dr. H. Kress
Prof. Dr. B. Linzen

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.1982

Für meine Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Rembold angefertigt.

Herrn Priv. Doz. Dr. H. Kress danke ich für seine Betreuung innerhalb der Fakultät für Biologie der Universität München.

Herrn Dr. T. Schäfer, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München, danke ich für wertvolle Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Rembold, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, der die für die Durchführung der Arbeit notwendigen Mittel großzügig bereitgestellt hat und mir mit seiner Kritik, seiner Anteilnahme und mit zahlreichen Diskussionen stets zur Seite stand.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT	4
II. MATERIAL UND METHODEN	12
1. Aufzucht der Versuchstiere	12
2. Faecesbestimmung	13
3. Applikation von Azadirachtin	13
4. Entnahme und Aufarbeitung der Hämolymphe	14
5. Ecdysteroidbestimmung	14
6. Elektrophorese	17
7. Immunohistochemie	18
8. Histologie	18
9. Photographische Dokumentation	18
III. ERGEBNISSE	20
1. Zur Dosis-Wirkungsbeziehung des Azadirachtins	20
2. Wirkung des Azadirachtins auf Larven	21
2.1 Dosis-Wirkungsbeziehung im 4. und 5. Larvenstadium	22
2.1.1 Entwicklungsdauer und Mortalität	23
2.1.2 Einfluß auf die Gewichtszunahme	24
2.1.3 Häutungs- und Fraßhemmung	26
2.1.4 Morphologische Veränderungen und Einfluß auf den Häutungsablauf	27
2.1.5 Histologisches Bild der Häutungs- hemmung	32
2.2 Wirkung des Azadirachtins auf die hormo- nelle Kontrolle der Kutikulabildung	35

	Seite
2.2.1 Verlauf der Ecdysteroid-Titer bei unbehandelten Larven	37
2.2.2 Einfluß von Azadirachtin auf den Titerverlauf der Ecdysteroide im fünften Larvalstadium	40
2.2.3 Abhängigkeit der Azadirachtinein- wirkung vom Injektionszeitpunkt	44
2.2.3.1 Viertes Larvalstadium	
2.2.3.2 Fünftes Larvalstadium	
2.2.4 Effekt von Gehirnhomogenat auf mit Azadirachtin behandelte Larven	48
3. Wirkungen des Azadirachtins auf adulte Weibchen	49
3.1 Wirkung auf Körpergewicht und Mortalität	49
3.2 Wirkung auf die Nahrungsaufnahme	51
3.3 Wirkung auf die Oogenese	54
3.3.1 Wirkung von Azadirachtin auf Kon- zentration von Hämolympheproteinen	57
3.3.2 Einfluß des Azadirachtins auf die Vitellogenin-Konzentration	59
3.3.3 Morphologisches Bild der Oogene- sehemmung	61
3.4 Wirkung auf den Ecdysteroidtiter im Ovar	62
3.4.1 Injektion von Azadirachtin während der Vitellogenese	63
3.4.2 Injektion von Azadirachtin vor der Vitellogenese	66
3.4.3 Embryogenese - Fehlentwicklung nach Injektion von Azadirachtin	68

	Seite
4. Wirkung des Azadirachtins auf das neurosekretorische System	73
4.1 Histologie des Gehirns	73
4.1.1 Neurosekretorische Aktivität der Kontrolltiere	73
4.1.2 Wirkung von Azadirachtin auf die Neurosekretion	74
4.2 Histologie der Corpora allata	78
4.2.1 Wirkung des Azadirachtins auf die Corpora allata	80
5. Umsteuerung von Entwicklungsvorgängen durch Azadirachtin	83
5.1 Änderung im Entwicklungsablauf	83
5.1.1 Vitellogeninsynthese im Larvalstadium	83
5.1.2 Ovardifferenzierung im Larvalstadium	86
IV. DISKUSSION	
1. Dosis-Wirkungsbeziehung	91
2. Der Effekt der Fraßhemmung	93
3. Wirkung auf den Ablauf der Häutung	94
4. Wirkung auf die Eireifung	97
5. Wirkung auf die Neurosekretion	100
6. Umsteuerung und Differenzierungsprozesse	103
7. Der Wirkungsmechanismus des Azadirachtins	105
V. ZUSAMMENFASSUNG	107
VI. LITERATUR	110
VII. LEBENS LAUF	119

I. EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Eine wechselseitige Anpassung, Folge eines gerichteten und koordinierten Selektionsprozesses, bestimmt das Miteinander von Pflanze und Tier. Zu den lebensfördernden und lebenserhaltenden Mechanismen einer Art gehört neben symbiontischer Anpassung (z.B. Bestäubung von Pflanzen durch Tiere) der Schutz vor dem Gefressenwerden. Zahlreiche sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe sind bekannt, zum Schutz vor Insekten-, Pilz- und Bakterienbefall (Phenole, Chinone, Alkaloide, Säuren, Laktone, Terpene). In den letzten Jahren wurden natürlich vorkommende Fraßhemmer und Wachstumsregler verschiedener Substanzklassen aus zahlreichen Pflanzenarten mit der Zielrichtung isoliert und bestimmt, sie zur Kontrolle von Insektenschädlingen auf Nutz- und Kulturpflanzen einzusetzen.

Bereits seit langer Zeit werden Blätter und Samen von Neem, dem indischen Flieder (Azadirachta indica A. Juss), in Asien und Afrika zum Pflanzenschutz gegen Getreide- und Vorratschädlinge verwendet. Früh wurde erkannt, daß Blätter und Früchte von A. indica auf holo- und auf hemimetabole Insektenarten fraßabschreckend wirken (Fry and Sons, 1938; Volkonsky, 1937).

Die fraßabschreckende Wirkung von Neem-Extrakten ist hauptsächlich auf eine Substanz zurückzuführen, deren Partialstruktur von Butterworth und Morgan (1968, 1971) beschrieben

ben und die als Azadirachtin (Summenformel $C_{35}H_{44}O_{16}$) bezeichnet wurde. Für dieses Tetranortriterpenoid wurde von Zanno et al. (1975) die folgende Struktur vorgeschlagen.

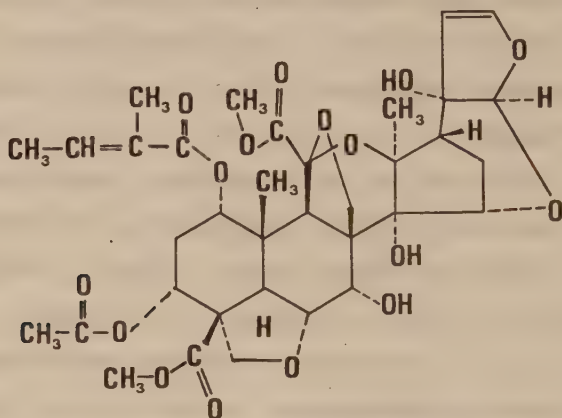


Abb. 1

AZADIRACHTIN

Neben Fraßhemmung verursacht Azadirachtin bei Larven verschiedener Insektenordnungen, z.B. Lepidopteren und Coleopteren, denen mit Azadirachtin besprühte Blätter verfüttert wurden, Metamorphosestörungen (Ruscoe, 1972; Rembold et al., 1980; Schmutterer und Rembold, 1980). Bei E. varivestis und L. decemlineata (Steets und Schmutterer, 1975; Steets, 1976) und L. migratoria (Rembold und Sieber, 1981) wurde eine Hemmung des Reproduktionsvermögens beobachtet. Die hohe Wirksamkeit von Azadirachtin auf Fraßverhalten und Metamorphose von Insekten bei gleichzeitiger nichttoxischer Wirkung auf Vertebraten (Jacobson, 1981) wurde 1980 auf der Neem Conference von Schmutterer et al. (1981) zusammenfassend dargestellt.

Elektrophysiologische Untersuchungen zum Mechanismus der fraßabschreckenden Wirkung wurden bei L. migratoria und S. gregaria durchgeführt (Blanley und Winstantley, 1980). Über den Mechanismus der Azadirachtinwirkung auf die Metamorphose herrscht dagegen noch Unklarheit. Spekulationen, wonach es wegen einer Strukturähnlichkeit mit Ecdyson direkt mit dem Häutungshormon interferieren soll (Ferez, 1972), konnten bis heute nicht bestätigt werden.

Azadirachtin hemmt in geringster Dosierung die Insektenentwicklung, hat jedoch keine schädigende Wirkung bei Vertebraten. Dies läßt vermuten, daß insekten- und entwicklungsspezifische Kontrollmechanismen beeinflußt werden. Für die Untersuchung der Wirkungsweise von Azadirachtin ist die genaue Kenntnis der endokrinen Kontrolle von Entwicklungsvorgängen, wie Metamorphose und Eientwicklung, Voraussetzung.

Kopeć (1917) und schließlich die klassischen Experimente von Wigglesworth (1934, 1940) über die Entwicklung von R. prolixus haben das Gebiet der Insektenendokrinologie begründet. Sie zeigten, daß ein Faktor des Gehirns, besonders der neurosekretorischen Zellen des Protocerebrums, die Häutung initiiert. Er induziert die Prothorakaldrüsen, ein Hormon zu synthetisieren (Williams, 1947), das als eigentliches Häutungshormon die Epidermis stimuliert, eine neue Kutikula zu synthetisieren. 1954 gelang es, dieses Häutungshormon zu isolieren (Butenandt und Karlson, 1954) und seine Struktur aufzuklären (Karlson, 1956). Dieses Ecdyson ist

ein Steroidhormon, seine biologisch aktive Form das 20-Hydroxyecdyson (Abb. 2).

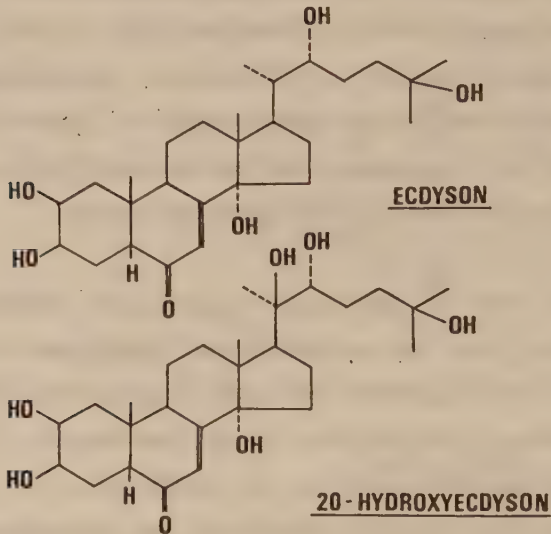


Abb. 2: Die Struktur des Ecdysons und 20-Hydroxyecdysons

Wiederum Wigglesworth (1934) wies ein weiteres Hormon, das Juvenilhormon (JH) nach, das in der Lage war, den Modus der Häutung zu bestimmen. Es wird von den Corpora allata, paarigen, caudal vom Gehirn gelegenen Drüsen ausgeschüttet. Dieses Hormon verhindert die Metamorphose und bewirkt eine weitere Larven - Larvenhäutung. Die Juvenilhormone sind Sesquiterpene, die sich vom Farnesensäuremethylester ableiten. JH-I wurde von Rölller (1967) isoliert und seine Struktur durch Synthese bewiesen (Dahm et al., 1967). Abb. 3 gibt die Struktur der vier natürlich vorkommenden Juvenilhormone wider.

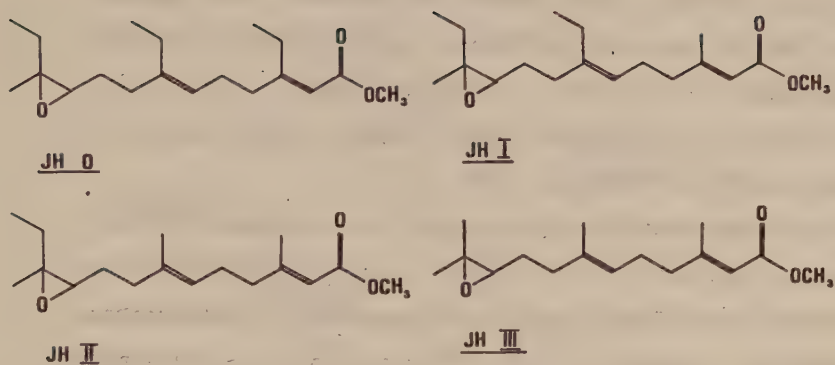


Abb. 3: Die Struktur der vier natürlich vorkommenden Juvenil hormone (JH).

Das "klassische Schema" des Zusammenspiels von JH und 20-Hydroxyecdysen wurde von vielen Autoren beschrieben (Gilbert, 1964; Wiggelsworth, 1964; Highnam, 1968; Röllner und Dahm, 1968). Nach diesem Schema produzieren die neurosekretorischen Zellen des Gehirns Faktoren, die über Neurohämalorgane (Corpora cardiaca) in die Hämolymphe ausgeschüttet werden und von hier zu den Prothoraxdrüsen und den Corpora allata gelangen. Sie stimulieren die Abgabe von Ecdysen bzw. JH. Ecdysen induziert Häutungsprozesse, während ein hoher JH-Titer zur Zeit des Ecdysteroidpeaks die Häutung in Richtung einer larvalen Ausprägung moduliert und adulte Strukturen unterdrückt. Ein Abfall des JH-Titers resultiert bei holometabolen Insekten in einer Larven - Puppenhäutung, das Fehlen von JH in einer Puppen - Adulthäutung, die nur von 20-Hydroxyecdysen kontrolliert wird.

20-Hydroxyecdysone wirkt direkt im Zellkern, indem das Hormon, ähnlich den Steroidhormonen bei Vertebraten, an cytoplasmatische und nukleäre Rezeptoren bindet (Yund et al., 1978) und Genaktivitäten ändert (Becker, 1962; Ashburner, 1980; Clever und Karlson, 1960).

Der Wirkungsmechanismus von JH ist noch unbekannt. Es existieren zahlreiche Hinweise darauf, daß JH ähnlich wie die Steroidhormone über eine Gen-Derepression die RNA-Synthese stimuliert (Engelmann, 1971), aber auch auf die Zellmembranen wirkt (Davey, 1981).

JH reguliert außerdem in der Mehrzahl der Insektenarten die Eireifung durch Vitellogeninsynthese im Fettkörper und seine Aufnahme in sich entwickelnde Oozyten (Johnson und Hill, 1975; Engelmann, 1979; Chen et al., 1976; Lanzrein et al., 1975), bei bestimmten Dipteren kontrolliert 20-Hydroxyecdysone die Eireifung und Vitellogeninsynthese (Hagedorn und Fallon, 1973; Hagedorn et al., 1975). Die Prothoraxdrüsen sind inaktiv, der Syntheseort von Ecdysteroiden ist das Ovar. Die von Follikelzellen des Ovars synthetisierten Ecdysteroiden greifen bei L. migratoria nicht in die Kontrolle der Eireifung ein, sondern werden als Konjugate in den wachsenden Oozyten gespeichert (Lagueux et al., 1977). Die endokrine Kontrolle von Entwicklungsvorgängen ist in Abb. 4 zusammengefaßt.

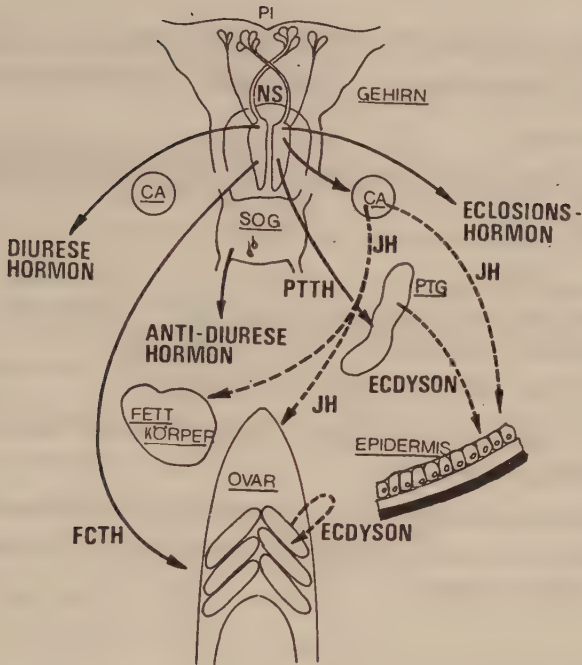


Abb. 4: Schematische Darstellung der endokrinen Steuerung von Entwicklung und Eireifung in *L. migratoria*. PI: Pars intercerebralis, CC: Corpora cardiaca, CA: Corpora allata, PTG: Prothoraxdrüse, SOG: Suboesophagalganglion, NS: Neurosekretorisches Material, ATH: Allatotropes Hormon, PTTH: Prothoracotropes Hormon, FCTH: Follikelzellen-stimulierendes Hormon, JH: Juvenilhormon. —————> : Weg der Peptidhormone des CC, -----> : Weg der peripheren Hormone (Ecdyson, JH).

Die vorliegende untersuchung über die Wirkung des Azadirachtins auf die postembryonale Entwicklung, die Eireifung und ihre Steuerung wurde an der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria migratoroides* (R & F) durchgeführt. Ihre Größe und einfache Handhabung erlaubt sowohl Hormonuntersuchungen am Einzeltier als auch chirurgische Manipulationen und Injektionen. Azadirachtin, welches aus Neemsamen gewonnen wurde, stand als reine Substanz nach Darstellung

mittels offener Silicagel-Säulenchromatographie, TLC- und HPLC-Reinigung (Rembold et al., 1980) für die Untersuchungen zur Verfügung.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Problemstellungen untersucht:

1. Welcher Art sind die morphologischen Effekte von injiziertem Azadirachtin bei L. migratoria?
2. Wodurch werden diese Effekte ausgelöst?
3. Liegt eine toxische (cytotoxische) Wirkung des Azadirachtins vor?
4. Wirkt Azadirachtin auf die Entwicklung über eine Interaktion mit der endokrinen Kontrolle, und wenn, auf welcher Ebene?

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Aufzucht der Versuchstiere

Locusta migratoria migratoroides (Reiche und Farm) wurde in mit Gaze bespannten Holzkäfigen (60 cm x 50 cm x 50 cm) gehalten. Die Käfige konnten mit einer einschiebbaren Wand unterteilt werden, um die Populationsdichte annähernd konstant zu halten. Die Populationsgröße variierte zwischen 20 und 30 Tieren pro Käfig. Die Individuen wurden dadurch in der Wanderphase gehalten. Die solitär lebende Locusta zeigt unter gleichen Bedingungen eine andere Entwicklungskinetik. Da die Anwesenheit von Männchen einen Einfluß auf die Geschlechtsreife adulter Weibchen ausübt, wurden die Populationen immer gemischt gehalten.

Die Tiere erhielten jeden 2. Tag frische Weizenkeimlinge als Nahrung. Als Licht- und Wärmequelle diente eine 100 W-Glühbirne. Der Hell-Dunkel-Rhythmus betrug 12:12 Stunden, die Temperatur in den Käfigen 38 (12 Stdn. Licht) bzw. 24°C (dunkel). Die relative Luftfeuchtigkeit wurde durch Befeuchter auf 40 % gehalten. Eier wurden in Plastikschaalen (Vitri, Mühlthal; 20 cm x 10 cm x 8 cm) abgelegt, die mit feuchtem Aquariensand gefüllt waren. Eigelege wurden jeden Tag aus den Legekästen entfernt und auf feuchtem Sand im Brutschrank bei 30°C und 60 % Luftfeuchtigkeit ausgebrütet. Datierte Tiere (von der letzten Häutung an gerechnet) wurden individuell mit Nummern auf Klebeband am Flügel oder mit Farbmarken auf dem Thorax gekennzeichnet.

2. Faecesbestimmung

Zur Ermittlung der Ausscheidungs menge als Parameter des Fraßverhaltens wurden den Tieren täglich zur gleichen Zeit frische Weizenkeimlinge angeboten. Zur Quantifizierung der Nahrungsaufnahme wurde vorausgesetzt, daß die Menge des aufgenommenen Futters mit der Menge der ausgeschiedenen Faeces korreliert ist. Die Tiere wurden jeden Tag gewogen und die Käfige täglich sorgfältig von Faeces gereinigt. Unmittelbar nach der Entnahme aus dem Käfig wurde das Gewicht der Faeces bestimmt (als Frischgewicht bezeichnet). Nach 24 Stunden Trocknung bei 30°C wurde wieder gewogen (Trockengewicht).

3. Applikation von Azadirachtin

Azadirachtin wurde bei der Herstellung der Lösungen (90%iges Ethanol) auf einer Feinst-Analysenwaage eingewogen und die exakte Konzentration nochmals durch HPLC anhand einer Eichkurve bestimmt. Die Tiere wurden vor der Injektion mit CO₂ betäubt. Die Lösung wurde mit einer 10 µl Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) durch die Intersegmentalhaut zwischen dem 3. und 4. Abdominalsegment injiziert. Kontrolltiere erhielten eine entsprechende Menge Lösungsmittel. Injektionen definierter Substanzmengen lassen sich so exakter reproduzieren als mit einem Microapplikator (ISCO, Lincoln, Ne), bei dem die injizierte Lösung oft nicht vollständig vom Tier aufgenommen oder wieder herausgedrückt wird.

4. Entnahme und Aufarbeitung von Hämolymphe

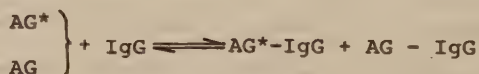
Hämolympfproben wurden Larven und adulten Tieren mit einer 20 µl- bzw. 10 µl-Mikropipette (Assistent, Sondheim) am Metathorax, hinter dem Sprungbein, entnommen. In der Regel pumpten die Tiere diese Hämolympfmenge selbst aus dem Körper. Mehr als die für Messungen benötigte Menge (10 - 20 µl) trat nie aus dem Körper aus und die Wunde verschloß sich sofort wieder. Für Protein- oder Hormonbestimmungen wurde die Hämolymphe in der Kälte aufgearbeitet.

5. Ecdysteroidbestimmung

Zur Ecdysteroidbestimmung wurden die Proteine eines definierten Hämolympfvolumens mit Methanol präzipitiert und der Überstand mit Dichlormethan/MeOH/Wasser (2:1:1) ausgeschüttelt. Die Ecdysteroide gehen hierbei quantitativ in die methanolische Phase. Auf SEP-PAK RP 18-Kartuschen (Waters, Königstein) wurden die Ecdysteroide weiter gereinigt und fraktioniert. Hochpolare Fraktionen wurden mit 6 ml Methanol/Wasser (7:3) eluiert. Ecdyson und 20-Hydroxyecdyson wurden quantitativ mit 10 ml Methanol/Wasser (1:1) eluiert. 10 ml Methanol eluierten schließlich die niedrig polaren Produkte. Die Extraktionsmethode führte zu keinen Verlusten, jedoch war die Trennung von Ecdyson und 20-Hydroxyecdyson auf SEP-PAK mit den verwendeten Elutionsmitteln nur unvollständig. Ecdyson und 20-Hydroxyecdyson wurden auf einer selbstgepackten RP 18-Säule (10 x 0,5 cm, Vorsäule 2,5 cm) mittels Hochdruck-Flüssigchromatographie (UV-Detektor Philips LC 3, Perkin-Elmer Pumpe, Serie 3,

Flow 1,5 ml/min, E = 0,01, Wellenlänge 240 nm, Nachweisgrenze für 20-Hydroxyecdysen 5 ng) mit Methanol/Wasser (3:7) als Laufmittel getrennt. Die Retentionszeit von Ecdysen war 4,1 min, von 20-Hydroxyecdysen 6,4 min. Durch Integration der Peakflächen wurde die Hormonmenge der biologischen Probe bestimmt. Als Referenzsubstanzen dienten Ecdysen (Serva, Heidelberg) bzw. 20-Hydroxyecdysen (Calbiochem, San Diego). Fraktionen mit gleichen Retentionszeiten wurden aufgefangen und ebenso wie die hoch polaren Fraktionen im Radio-Immuno-Assay (RIA) nach Spindler et al. (1978) und Borst und O'Connor (1974) gemessen. Andere HPLC-Peaks waren im RIA nicht aktiv.

Das Prinzip des RIA ist auf der Kompetition zwischen radioaktiv markiertem (AG*) und unmarkiertem Antigen (AG), bezogen auf die Bindung an spezifische Antikörper (IgG), begründet.



Unbekannte Antigenmengen von biologischen Proben wurden nach einer Eichkurve ermittelt, die mit bekannten Mengen Antigen erstellt worden war. Für die Eichkurve wurde zur Messung von larvalen Ecdysteroiden 20-Hydroxyecdysen, von Ecdysteroiden des Ovars Ecdysen als Referenz verwendet. Der Ecdysteroidgehalt biologischer Proben wurde in Ecdysen-Äquivalente ausgedrückt (Ecdysen eq.) und bezeichnet die Antigenmenge, welche im RIA wie Ecdysen bzw. 20-Hydroxy-

ecdyson mit dem Antikörper ICT-1 kreuzreagiert. Das anti-Ecdyson-Antiserum (ICT-1) war von K.D. Spindler* zur Verfügung gestellt (zu den Eigenschaften und seiner Kreuzreaktivität siehe Reum et al., 1979). Radioaktives Ecdyson ($23,24\text{-}^3\text{H(N)}$ -Ecdyson, 80 Ci/mmol) wurde von NEN (Dreieichenhain) bezogen. Die Messungen erfolgten in Glasröhrchen (50 mm x 4 mm) mit Unisolve Szintillator (Koch und Light, Colnbrook, England), Meßvolumen 300 μl , in einem Packard Tricarb 3380 Szintillationszähler. Verschiedene methanolische Verdünnungen der zu messenden biologischen Proben wurden unter Stickstoff getrocknet und eine definierte Menge tritiiertes Ecdyson in Boratpuffer (pH 8.4) zugegeben. Die Proben wurden bei 4°C 12 Stunden mit ICT-1 Antiserum inkubiert, anschließend wurde der gebildete Antigen-Antikörperkomplex mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung bei 4°C gefällt und zentrifugiert (7000 UPM). Nach Auflösen des Niederschlags in Wasser und Zugabe von Szintillator wurde die Aktivität der Proben im Zähler gemessen, und die Ecdysteroide anhand der Eichkurve quantitativ bestimmt. Die hoch polaren Fraktionen wurden zusätzlich mit Schnecken-saft von Helix pomatia (Sigma, München) in Acetatpuffer (pH 5,2) hydrolisiert. Das Enzymgemisch enthielt β -Glucuronidase (367,000 Fishman-Einheiten) und Arylsulphatase (20,000 $\mu\text{M/g}$). Mit 670 Fishman-Einheiten/biol. Probe wurde 18 Stunden bei 37°C inkubiert, 20 % der inkubierten

*Herrn Prof. Dr. K.D. Spindler, Universität Düsseldorf, danke ich für die Überlassung des Antiserums.

Probe wurde im RIA gemessen. Der Schneckensaft ist in diesen Mengen im RIA nicht aktiv (1000 Einheiten kreuzreagieren mit dem Antiserum wie 100 pg Ecdyson).

6. Elektrophorese

Die Hämolympfproben wurden bei 4°C zentrifugiert, um Hämocyten zu entfernen, und 10 µl des Überstandes in 100 µl Phosphatpuffer (250 mM, 150 mM NaCl), pH 8,0 aufgenommen. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden nach Fällung in 10%iger Trichloressigsäure nach Lowry et al. (1951) bestimmt. Aliquote von 20 µg Protein wurden mittels Na(Sodium)Dodecyl Sulphat (SDS) - Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) auf 10%igen Gelen und Gradientengelen (7 % - 12 %) in einer gekühlten LKB Elektrophoresekommer nach Laemmli (1970) analysiert. Die Elektrophorese wurde in 0,375 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,3) und 0,1 % SDS durchgeführt, der Probenpuffer (pH 6,8) enthielt 0,0625 M Tris-HCl, 2 % SDS und 5 % 2-Mercaptoethanol. Als Markerproteine wurden Standards von Bio-Rad (Richmond, Calif.) verwendet. Anschließend wurden die Proteine mit 0,25%iger Coomassie brilliant blue R-250-Lösung (Serva, Heidelberg) gefärbt. Zur Immunopräzipitation von Vitellogenin wurden Hämolympfproben mit 10 µl anti-Vitellogenin-Antiserum* über Nacht bei 4°C inkubiert und der entstandene Komplex mit Protein A-Agarose (Sigma, München) 60 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wur-

*Herrn Dr. C. Beckers, Universität Darmstadt, danke ich für die Überlassung des Antiserums.

den die Proben bei 6000 UPM zentrifugiert. Nach intensivem Waschen (5 x) des Niederschlags mit Phosphatpuffer (0,1 M/ 150 mM NaCl) wurden die Proteine elektrophoretisch (s.o.) getrennt.

7. Immunohistochemie

Tiefgefrorene Ovarien wurden in Formalinlösung (4 %) mit 0,1 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,4) 3 Stunden fixiert, danach in Saccharose-Puffer (5 % Saccharose, 5 % PBS, 0,7 % Carra-geenan, 0,2 % Triton) gewaschen. Die mit einem Leitz-Gefrier-schnitt-Mikrotom geschnittenen Präparate (Schnittdicke 30 µ) wurden mit dem Ecdyson-Antiserum ICT-1 inkubiert (Verd. 1:100) und anschließend mit dem Saccharose-Puffer intensiv gewaschen (6 x). Mit einem fluoreszierenden Antikörper (Fluorescein-Isothiocyant, FITC), der mit IgG von Kaninchen kreuzreagiert, wurden die Präparate inkubiert (2 Stdn.), der nicht gebundene Antikörper danach durch weiteres Waschen entfernt und die Schnitte auf einen Objektträger aufgezo-gen. Kontrollpräparate wurden mit Normalkaninchenserum in-kubiert.

8. Histologie

Histologische Präparate wurden in Bouin-Fixativ (Pikrin-säure, Formalin, Eisessig, 15:5:1) mindestens 48 Stunden lang fixiert. Nach Dehydrierung und Einbetten in Paraplast wurden die Objekte auf einem JUNG-Mikrotom (Jung, Heidel-berg) mit 10 µ Dicke geschnitten. Gefärbt wurde nach Adam und Czihak (1964) und Romeis (1968). Neurosekretorisches

Material ließ sich mit Paraldehydfuchsin (PAF) nach Gabe und mit Victoriablau nach Braak (siehe Romeis, 1968) anfärben, Übersichtspräparate¹ wurden mit AZAN nach Heidenhain (Adam und Czihak, 1964) gefärbt.

9. Photographische Dokumentation

Mikroskopische Präparate wurden mit einem Orthomat W in Verbindung mit einem Ortholux II Mikroskop (Leitz, Wetzlar) photographiert, größere Objekte mit einem Photomakroskop M 400 (Wild, Heerbroog, Schweiz).

III. ERGEBNISSE

1. Zur Dosis-Wirkungsbeziehung des Azadirachtins

In den letzten Jahren wurden umfangreiche Untersuchungen über metamorphosestörende und entwicklungshemmende Wirkungen von Azadirachtin in hemimetabolen und holometabolen Insekten durchgeführt. Beschrieben wurden in der Hauptsache Effekte nach topikaler Applikation und nach Aufnahme der Substanz durch die Nahrung oder durch Kontakt. Solche Methoden schließen einen teilweisen Abbau im Verdauungstrakt oder eine teilweise Retention durch die Kutikula nicht aus. Inwieweit eine zeitlich verzögerte Aufnahme in den Organismus bei den Azadirachtineffekten eine Rolle spielt, kann bei einer solchen Applikation ebenfalls nicht untersucht werden. Injektionen, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, ermöglichen dagegen neben der exakten Dosierung eine optimale Ausbreitung der Substanz im Körper ohne zeitliche Verzögerung und ebenso Untersuchungen an Insektenarten, bei denen Azadirachtin stark fraßhemmend wirkt.

Injiziertes Azadirachtin ruft in allen Entwicklungsstadien von Locusta migratoria ontogenetische und physiologische Störungen hervor. Für die exakte und quantitative Bestimmung reproduzierbarer Effekte wurde in bestimmten Entwicklungsabschnitten eine Dosis-Wirkungsbeziehung erarbeitet. Hierbei ist jedoch die absolute Menge der injizierten Substanz unbedingt in Beziehung zum Körpergewicht des inji-

zierten Tieres zu setzen, da das Gewicht sich je nach Entwicklungsstadium um das 15fache unterscheiden kann. Die injizierte Dosis errechnet sich aus dem Quotienten

$$\text{Dosis} = \frac{\text{injiz. Azadirachtin}}{\text{Körpergewicht}} \quad (\mu\text{g/g})$$

2. Wirkung des Azadirachtins auf Larven

Locusta migratoria durchläuft fünf Larvalstadien, in denen sich die Larven in Größe und verschiedenen morphologischen Merkmalen unterscheiden. Unter konstanten Bedingungen ist die Dauer der einzelnen Larvalstadien (Intermoult) mit nur sehr geringen Abweichungen durch ein endogenes Entwicklungsprogramm festgelegt. Die Größenzunahme erfolgt primär periodisch während des Häutungsprozesses. Die Häutung als charakteristisches Merkmal der Larvalzeit und ihre Störungen wurden zur Untersuchung der Wirkungsweise des Azadirachtins herangezogen. Da die häutungsinduzierenden Prozesse sehr früh während der Stadien einsetzen, wurde bereits zu Beginn (Tag 1 und 2) des jeweiligen Stadiums Azadirachtin injiziert. Damit konnten auch die frühen endokrinen Steuerungsprozesse experimentell erfaßt werden. Eine weitere Möglichkeit, die Wirkung von Azadirachtin näher zu untersuchen, bot die Injektion zu einem Zeitpunkt, in dem Syntheseprozesse und morphologische Prozesse der Häutung bereits begonnen hatten. Mit der genauen Kenntnis, ab wann eine exakt definierte Azadirachtindosis in der Hämolymphe der Larven appliziert war, waren Rückschlüsse

von morphologischen Störungen auf die Wirkungsweise des Azadirachtins möglich.

2.1. Dosis-Wirkungsbeziehung im 4. und 5. Larvenstadium

Nach Injektion von Azadirachtin zu Beginn der jeweiligen Larvalstadien (1. und 2. Tag) häuteten sich die Larven nicht innerhalb des Zeitraums, in dem unbehandelte Larven ihr Entwicklungsstadium beenden. Ebenso war bei den Versuchstieren der Häutungsablauf gestört oder vollständig gehemmt. Die Larven ohne Häutung lebten als Dauerlarven etwa fünf- bis zehnmal so lange wie Kontrolltiere der jeweiligen Stadien. Die zeitliche Veränderung von Larvalstadien sowie die Häutungshemmung wurden als quantifizierbare Effekte untersucht. Zur Bestimmung der ED_{50} wurden Azadirachtindosen zwischen $0,6 \mu\text{g/g}$ und $6 \mu\text{g/g}$ in Larven des vierten (vorletzten) und fünften (letzten) Stadiums injiziert. Mit steigender Dosis nahm die Häufigkeit der induzierbaren Effekte stark zu. Bereits bei $2 \mu\text{g/g}$ gelang es keinem Tier mehr, sich normal zu häuten. Die Dosisabhängigkeit von Azadirachtin war in den verschiedenen Larvalstadien identisch, obgleich die Tiere stadienabhängig grosse Gewichtsunterschiede aufwiesen (Abb. 5). Untersuchungen an Larven des 3. Stadiums (hier nicht aufgeführt) ergaben identische Effekte wie bei den späten Stadien.

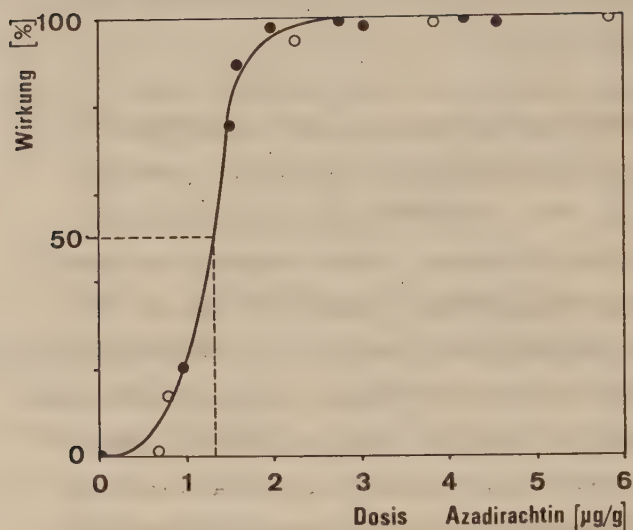


Abb. 5: Beziehung zwischen injizierter Azadirachtindosis und der Wirkung auf die Entwicklung im 4. und 5. Stadium. Mortalität und Stadienverlängerung bei gleichzeitiger Häutungshemmung sind zusammengefaßt. Populationen von 20 Larven (Männchen und Weibchen) wurden jeweils pro Dosis zu Beginn der Stadien injiziert. o: L4; ●: L5.

2.1.1. Entwicklungsdauer und Mortalität

Auch bei der Auffächerung der Effekte ergaben sich reproduzierbare Dosis-Wirkungsbeziehungen. Mit höherer Dosis wuchs die Dauer des Stadiums, über Gesamtpopulationen gemittelt (vgl. Abb. 17). Auch die Anzahl der Larven, die ohne Stadienverlängerung und Häutungsversuch starben, wuchs mit höherer Dosis an (Abb. 6). Dem war in der Regel ein starker Gewichtsverlust vorausgegangen.

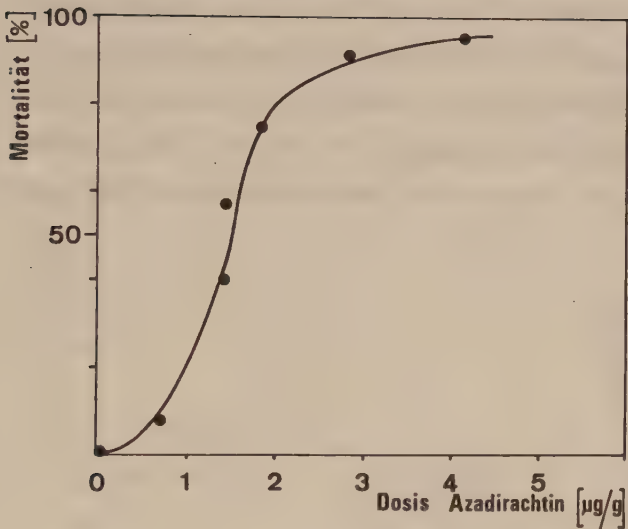


Abb. 6: Mortalitätsrate von L5 in Abhängigkeit von der injizierten Azadirachtindosis. Die LD₅₀ liegt bei 1,6 µg/g (n = 20 Larven/Dosis).

2.1.2. Einfluß auf die Gewichtszunahme

Populationen von 40 Larven wurden im fünften Stadium mit verschiedenen Azadirachtindosen (0,7; 1,4; 2,8; 4,2 µg/g) injiziert. Der Gewichtsverlauf wurde bei Weibchen und Männchen getrennt ermittelt, da sie in diesem Larvalstadium einen unterschiedlichen Gewichtsverlauf zeigen. Geschlechtsspezifisch signifikante Unterschiede in der Wirkung auf die Körpergewichtsreduktion wurden nicht gefunden, die Rate des Gewichtsverlustes war bei gleicher Dosis bei beiden Geschlechtern gleich. Bei geringer Dosis (0,7 µg/g) war der Gewichtsverlauf identisch mit dem von

Kontrollen. Ein Einfluß auf das Fraßverhalten war zwar bei höherer Dosis feststellbar ($1,4 \mu\text{g/g}$), die Larven nahmen aber an Gewicht zu, bis sie mit einer Verzögerung von ein bis zwei Tagen ebenfalls ein Gewicht erreichten, bei dem sich die Kontrolltiere häuten ($1,2 - 1,4 \text{ g}$). Eine weitere Erhöhung der Dosis hatte eine Gewichtsreduktion zur Folge (Abb. 7).

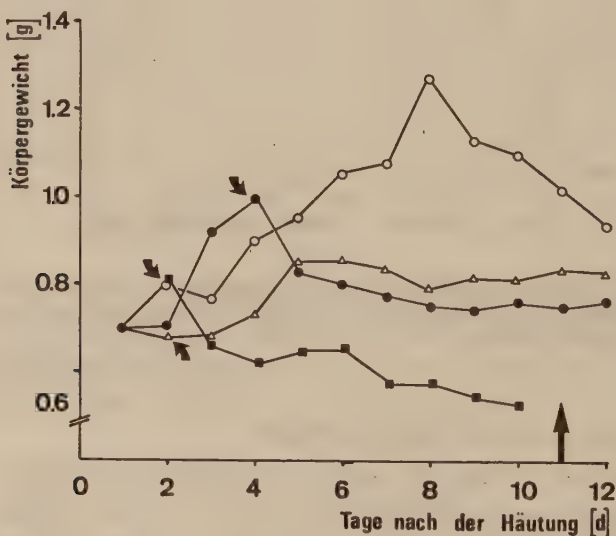


Abb. 7: Dosisabhängiger Gewichtsverlauf von L5 (Weibchen) nach Azadirachtinbehandlung ($n = 15$ Larven/Dosis, $sm = 0,6 - 0,3 \text{ g}$); o: $0,7 \mu\text{g/g}$; Δ : $1,4 \mu\text{g/g}$; •: $2,8 \mu\text{g/g}$; ■: $4,2 \mu\text{g/g}$; $\blacktriangledown$: Injektionszeitpunkt; $\uparrow$: Häutung von Kontrollen.

Die Ergebnisse legen zwei Fragen nahe:

1. Wird die Gewichtsabnahme durch Fraßhemmung hervorgerufen?
2. Ist die Hemmung der Häutung durch Unterernährung bedingt?

2.1.3. Häutungs- und Fraßhemmung

Einer Population datierter Larven des fünften Stadiums ($n = 7$) wurde vier Tage nach der Häutung Azadirachtin ($1,8 \mu\text{g/g}$) injiziert. Eine andere Population erhielt ab dem Injektionszeitpunkt kein Futter. Täglich wurde Gewicht und Faecesmenge bestimmt (Abb. 8).

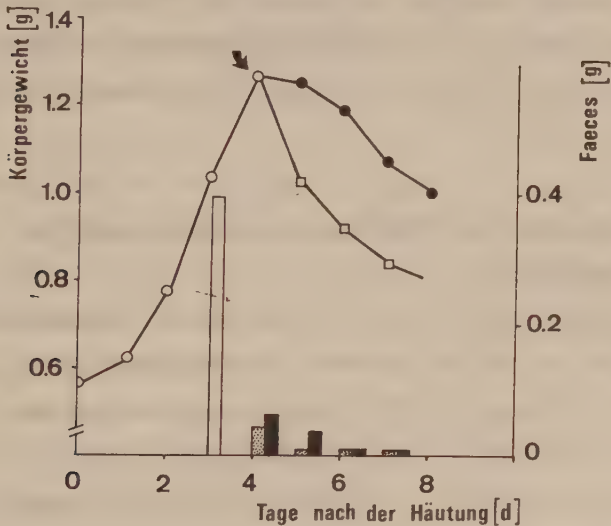


Abb. 8: Gewichtsverlust bei L5 durch Fraßhemmung nach Injektion von Azadirachtin (●) und bei Hungertieren (□). Gewicht der Tiere vor Versuchsbeginn: ○, Faeces pro Tag und Tier: ■ vor Versuchsbeginn, ■ nach Azadirachtin-Injektion, ■ Population ohne Futter.

Mit Azadirachtin injizierte Larven schieden schon am ersten Tag nach der Applikation mehr Faeces aus als Hungertiere, obwohl sie bei weitem nicht so stark an Gewicht abnahmen. Daraus konnte geschlossen werden, daß Larven nach Azadirachtin-Injektion trotz ihres Gewichtsverlustes Nahrung

aufgenommen hatten. Obgleich Hungertiere im gleichen Zeitraum wesentlich mehr an Gewicht verloren, häuteten sich alle Larven, bis auf ein Tier, völlig normal und in der gleichen Zeit wie die mit Ethanol injizierten Kontrollen. Von den mit Azadirachtin behandelten Larven häutete sich ein Tier, die anderen starben ohne Häutungsversuch. Als Ursache für die Häutungshemmung spielt die Fraßhemmung nur eine untergeordnete Rolle. Die häutungshemmende Azadirachtindosis ($1,3 \mu\text{g/g}$, vgl. Abb. 5) liegt unterhalb der Fraßinhibition.

2.1.4. Morphologische Veränderungen und Einfluß auf den Häutungsverlauf

Die Larvenhäutung läuft meist nach dem streng festgelegten Schema ab, das bei Hughes ausführlich beschrieben wurde (Hughes, 1980a, Vincent, 1971). Die eigentliche Ecdysis beginnt, wenn die Larve die Nahrungsaufnahme einstellt. Sie endet mit dem Beginn der Nahrungsaufnahme im nächsten Stadium. Die Einteilung der Häutung in sechs Phasen beinhaltet die zwei ersten Phasen des Verhaltens vor dem Schlüpfen, den Schlüpfvorgang als Phase drei und vier, die Expansion der neuen Kutikula als Phase fünf und schließlich das postexpansive Verhalten (Hughes, 1980 a und b).

Mit Azadirachtin injizierte Larven wiesen eine starke Störung dieser Abfolge auf. So stellten behandelte Larven nach erfolgter Apolyse das Fressen nicht ein und das Aufpumpen des Darms mit Luft zum Sprengen der Exuvie unter-

blieb. Häufig wurde das für die Larven-Adulthäutung notwendige Aufhängen an den Sprungbeinen oder das Aufsuchen vertikaler Positionen (Phase zwei) unterlassen. Die Exuvie platzte an der dorsalen Mittellnaht des Meso- und Metathorax und der Kopfkapsel auf, jedoch versuchten nur wenige Tiere, sich herauszuarbeiten. Es traten häutungsbereite Larven auf, deren Exuvie bereits vollständig vom Abdomen abgestreift war, die aber immer noch umherliefen. Die Phase vier wurde von keiner der Larven erreicht, das motorische Expansionsprogramm also nicht begonnen. Ursache war immer das Ausbleiben der rhythmischen, wellenförmigen Kontraktionen des Abdomens, welche den Thorax aus der Exuvie schieben (Hughes, 1980b). Die Exuvialflüssigkeit wurde bei den häutungsbereiten Larven, denen Azadirachtin injiziert worden war, im Gegensatz zu den Kontrolltieren nicht resorbiert, die Tiere waren "naß". Wurde die Exuvie vorsichtig mit einer Pinzette abpräpariert, härtete die darunterliegende neue Kutikula nicht aus und war nur schwach pigmentiert. Sie färbte sich auch nach drei bis vier Tagen nicht dunkel, ein Zeitraum, in dem behandelte Larven nach versuchter Häutung ohne Nahrungsaufnahme noch etwa vier Tage leben. Bei normal ablaufender Häutung ist die Pigmentierung und Sklerotisierung nach etwa sechs Stunden beendet. Bei einer geringen Azadirachtindosis ($0,5 - 1 \mu\text{g/g}$) war der Häutungsverlauf meist normal. Das Auftreten von verkrüppelten Tieren beruhte auf einer Sklerotisierung vor Beendigung der Flügelexpansion oder auf vorzeitiger Belastung der Gliedmaßen, da der Häutungs Vorgang etwas länger als

normal dauerte. Überraschenderweise wiesen behandelte Larven des vierten Stadiums, die sich ohne Erfolg zu häuten versucht hatten, adulte Merkmale auf. Dies konnte eindeutig aufgrund der Kutikulafärbung und vor allem der Zeichnung des Notums belegt werden. Obgleich Locusta migratoria normalerweise sowohl in natürlicher Umgebung als auch im Labor je nach Bedingungen sehr starke Unterschiede zeigt, zum Beispiel abhängig von der Populationsdichte (schwarz-orange), Feuchtigkeit (grün-hell), Pigmenteinlagerung (rot), können innerhalb von zwei aufeinanderfolgenden Larvalstadien keine solch drastischen Farbänderungen beobachtet werden wie bei den mit Azadirachtin behandelten Larven. Bei diesen Tieren geht die Änderung der Färbung von schwarz zu weiß-beige auf eine adultoide Ausprägung zurück (Abb. 9, 10). Darauf deutet auch die geringe Größenzunahme der Kopfkapsel hin, die für die Larven-Adulthäutung charakteristisch ist. Histologische Untersuchungen belegten, daß die etwas kleinere Kopfkapsel nicht auf ein mangelndes Aufpumpen zurückzuführen war. Da die Tiere die Häutung nicht beenden konnten und die Flügel nicht entfaltet wurden, ließ sich die Flügelstellung nicht zur Charakterisierung der adultoiden Ausprägung heranziehen.

Eine anormale Strukturierung und ein transparentes Aussehen der Kutikula deutete auf eine fehlerhafte Kutikulogenese hin. Belegt wurde die Störung der Kutikulabildung durch die Untersuchungen sensorischer Haare, mit deren Hilfe

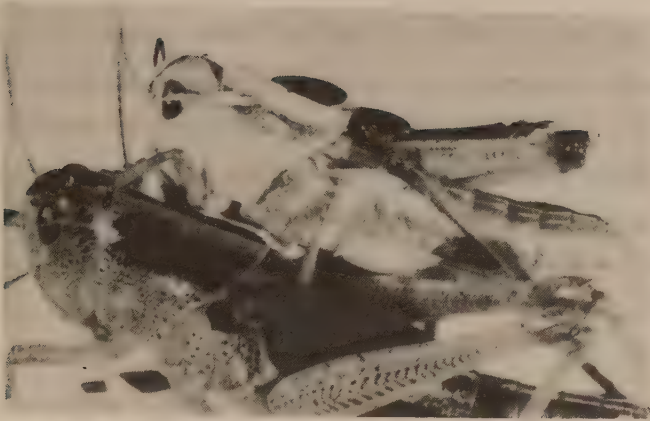


Abb. 9: Adultoide Ausprägung der neuen Kutikula einer L4 nach Azadirachtin-Behandlung mit Häutungshemmung (die nicht abgestreifte Exuvie wurde vollständig abpräpariert). Im Vordergrund eine unbehandelte Larve des fünften Stadiums mit larvaler Pigmentierung (rotbraun mit breiten schwarzen Streifen des Notums).

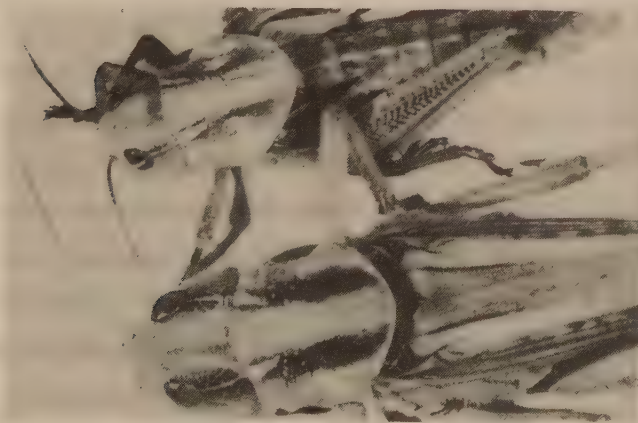


Abb. 10: Vergleich der morphologischen Ausprägung einer mit Azadirachtin behandelten L4 (vgl. Abb. 9) mit einem adulten Weibchen. Färbung der Kutikula und Zeichnung sind identisch.

zwischen Adulten und Larven unterschieden werden kann (Tab. 1). Diese Sensoren sind in mehreren Feldern um die Komplexaugen der Tiere angeordnet. Ihre Zahl ist von Stadium zu Stadium signifikant verschieden. Mit Azadirachtin behandelte Larven, die sich zu häuten versuchten, besaßen meist keine Haare in den Haarfeldern, was vermuten ließ, daß diese Tiere keine voll ausgebildete Kutikula hatten.

Tab. 1: Anzahl von sensorischen Haaren in Feldern oberhalb der Komplexaugen bei verschiedenen Entwicklungsstadien von Locusta migratoria.

Stadium	Haarzahl (gesamt)	vorderes Haarfeld
L4	19 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1
L5	31 $\pm$ 2	16 $\pm$ 1
Adult	37 $\pm$ 2	20 $\pm$ 2

Bei manchen Larven wies die Kopfkapsel unterschiedliche Entwicklungsstufen in der Kutikulogenese auf, was sich darin manifestierte, daß die Haarfelder eines Komplexauges durchaus Rezeptoren in ausreichender Zahl aufwiesen, während die Haarfelder des anderen Auges keine Haare hatten. Eine einseitige Störung ließ sich ebenso an der unterschiedlichen Ausprägung der Sklerotisierung und Pigmentierung der Mandibeln zeigen. Diese wiesen meist extreme Asymmetrie auf.

Larven mit unterschiedlich starker Störung der Kutikula-bildung blieben jedoch immer in der gleichen Phase der Häutung stehen. Die Exuvie platzte an den vorgebildeten Nähten der Kopfkapsel und des Notums auf. Im weiteren Verlauf blieben die Larven in diesem Zustand, die Exuvie konnte nicht weiter abgestreift werden. Am Versuch, die alte Kutikula zu sprengen, ließ sich nicht ablesen, wie weit die Larve im Häutungsprozeß war, da dieser offensichtlich nicht mehr koordiniert ablief.

2.1.5. Histologisches Bild der Häutungshemmung

Für histologische Präparate wurde den Tieren ein Stück von der Kutikula mit Epidermis aus dem vorderen Haarfeld entnommen. Die Entnahme erfolgte immer aus der gleichen Region, weil der Aufbau und die Dicke der Kutikula von Region zu Region sehr unterschiedlich sein können. Die Schnitte der Epidermis und der Kutikula ergaben nach der Färbung (AZAN) ein kontrastreiches Bild, in dem die Kutikula, unterteilt in die blau gefärbte Endokutikula und in die rot gefärbte Exokutikula, deutlich von der orange gefärbten Prokutikula unterschieden werden kann (Abb. 11).

Kontrollpräparate zeigten die typische phasenabhängige Veränderung der Epidermiszellen und Schichtung der kutikulären Ablagerungen, während bei mit Azadirachtin behandelten Larven größere Störungen sichtbar wurden. Interzellulär-räume der gestreckten Zellen waren deutlich vergrößert, die Epidermiszellen teilweise zerstört und die Zellkerne nicht mehr sichtbar (Abb. 12).

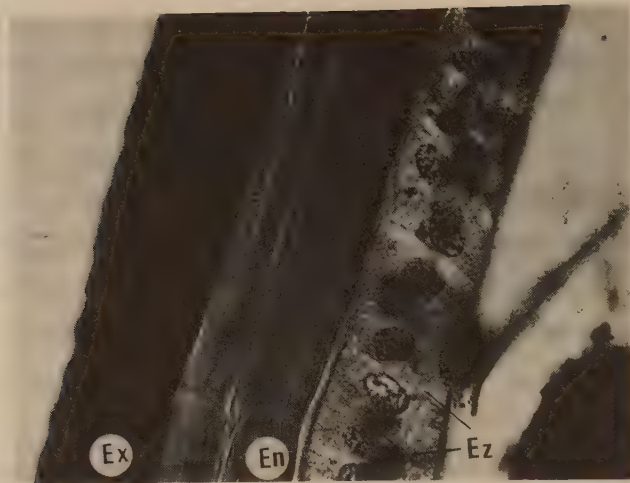


Abb. 11: Epidermis mit Kutikula einer Kontrolllarve (L5) aus der Kopfregion. Ex: Exokutikula, En: Endokutikula, Ez: Epidermiszellen,

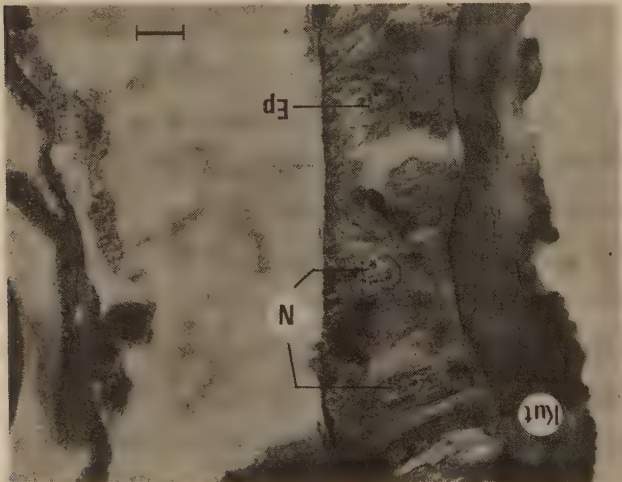
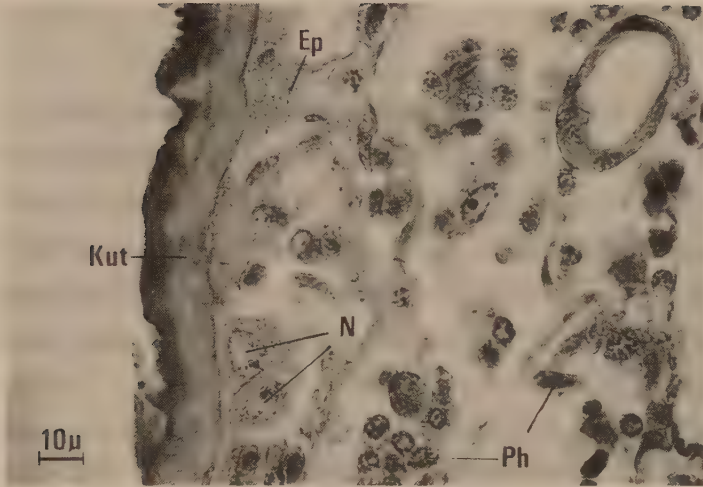


Abb. 12: Epidermis mit Kutikula einer mit Azadirachtin behandelten Larve, die nach Stadienverlängerung versucht, sich zu häuten (Larven-Larvenhäutung mit adultoider Ausprägung). Injektion am 2. Tag des 4. Stadiums. Kut: Exo- und Endokutikula fließen ineinander, Ep: Epidermis, N: Nuclei,



ADD. 13: Wirkung von Azadirachtin auf die Epidermis und die Kutikulogenese einer L4. Die Epidermiszellen sind teilweise zerstört, Exo- und Endokutikula fließen ineinander, die Cutis ist nicht zu erkennen. Kut: Kutikula, Ep: Epidermis, N: Nuclei, Ph: Phagocyten.

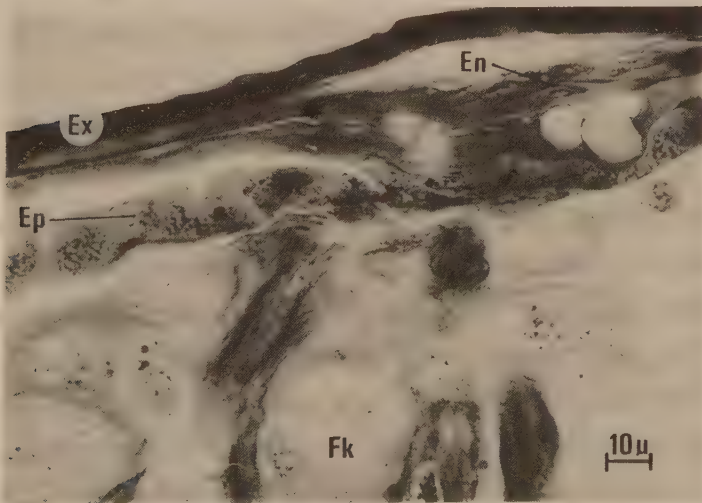


Abb. 14: Beginnende Lyse der Endokutikula (Apolysebeginn) im Abdomen einer Larve im fünften Stadium, 53 Tage nach der letzten Häutung. Injektion von Azadirachtin am 1. Tag nach der Häutung. Ex: Exokutikula, En: Endokutikula, Ep: Epidermis (Nuclei nicht erkennbar), Fk: Fettkörperzellen mit tröpfchenförmigen Einschlüssen.

Die Kutikula dieser Tiere war in manchen Bereichen abnorm ausgebildet, andere Bereiche derselben Präparate waren weniger in der Kutikulabildung gestört. Daran war zu erkennen, daß ganze Teilbereiche in der Kutikulogenese gestört waren. Endo- und Exokutikula flossen unregelmäßig ineinander, die Epikutikula war nur schwach ausgebildet oder nicht mehr erkennbar (Abb. 13).

Larven mit extremer Stadienverlängerung ohne Anzeichen von Häutung wurden ebenfalls histologisch untersucht. Hier waren die Epidermiszellen meist normal. Abgesondertes Schaumsekret wurde sichtbar und eine beginnende Lyse der Endokutikula war zu erkennen. Gleichzeitig waren erste Ansätze einer Apolyse zu sehen, die offensichtlich nicht weitergeführt wurde (Abb. 14).

2.2. Wirkung des Azadirachtins auf die hormonelle Kontrolle der Kutikulabildung

Neben der Möglichkeit, daß der häutungshemmende Effekt des Azadirachtins rein cytotoxischer Natur ist, könnten auch Wechselwirkungen mit der endokrinen Kontrolle Ursache für die auftretenden Störungen sein. In erster Linie ist hier an das Häutungshormon Ecdyson und seine Metabolite zu denken, das in seiner biologisch aktiven Form, als 20-Hydroxyecdyson, Häutungsprozesse induziert und steuert. Das in der Prothoraxdrüse (prothoracic gland, PTG) gebildete Hormon wirkt direkt auf die Epidermiszellen ein. Kein äußerer Stimulus wird benötigt, um die Kutikulogenese zu vollenden.

Andere Hormone, die ebenfalls Häutungsprozesse steuern, spielen eine untergeordnete Rolle. Die Kutikulabildung der Epidermiszellen wird durch etwa 10^{-6} bis 10^{-7} M 20-Hydroxyecdysen induziert, wie in vitro Versuche zeigten (Caruelle und Caruelle, 1978; Marks und Holman, 1979). Ähnliche Titer werden auch in vivo gefunden (Wielgus et al., 1979), wo sie in einer definierten Konzentrations-Zeitbeziehung die Kutikulabildung regulieren. Um mögliche Einflüsse des Azadirachtins auf den Ecdysteroidmetabolismus nachweisen zu können, wurde zunächst der Hämolymphtiter des vierten und fünften Stadiums, nach chromatographischer Vorreinigung, mittels Radio-Immuno-Assay (RIA) bestimmt. Mit dem Antiserum ICT-1 werden mehrere Ecdysterioide erfaßt. Da Ecdysen im RIA stärker mit ICT-1 kreuzreagiert als 20-Hydroxyecdysen, obgleich es nur 1 % der biologischen Aktivität von 20-Hydroxyecdysen besitzt (Caruelle und Caruelle, 1978; Riddiford, 1978), mußten in den Fällen, in denen die Bestimmung des biologisch relevanten 20-Hydroxyecdysens allein notwendig war, die Ecdysteroid-Metabolite der einzelnen Proben mittels Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC) getrennt werden. Hämolympfproben wurden von auf die Stunde datierten Larven alle 24 Stunden entnommen. Die Entnahme hatte keinen Einfluß auf den Zeitverlauf der Stadien. Die Larven häuteten sich wie Kontrolltiere nach 6,4 (viertes Larvenstadium) bzw. 9,6 Tagen (fünftes Larvenstadium).

2.2.1. Verlauf der Ecdysteroid-Titer bei unbehandelten Larven

Im vierten Larvalstadium stieg die Gesamtecdysteroid-Konzentration in der Hämolymphe ab dem dritten Tag an und erreichte am fünften Tag ein Maximum von 10 - 12 ng/ μ l. Danach sank sie sehr schnell auf ein kurz vor der Häutung liegendes Minimum ab (Abb. 15). Möglicherweise existiert

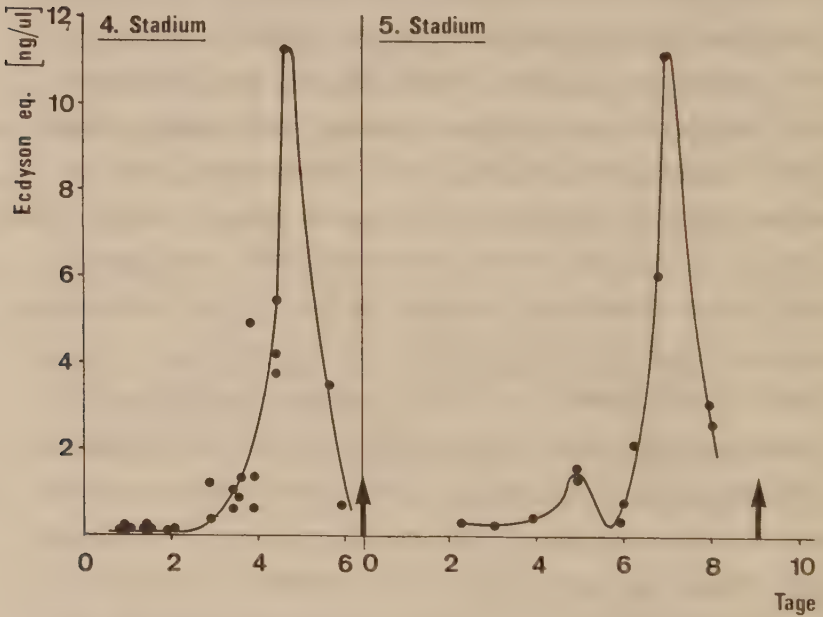


Abb. 15: Ecdysteroid-Titer von datierten Larven ($\pm$ 3 Stdn.) des vierten und fünften Stadiums. Einzeltiermessungen von Hämolympheproben ($\bullet$). $\blacktriangle$: Häutung. Die Messungen erfolgten ohne chromatographische Vorreinigung der biologischen Proben.

an der Flanke des Titeranstiegs, etwa am dritten Tag, ein kleiner Vorpeak, der jedoch wegen ungenügender Synchronisation der Larvenpopulationen nicht erfaßt werden konnte. Im fünften Stadium war am fünften Tag ein Vorpeak mit etwa 1 ng/ μ l nachweisbar. Der Hauptpeak erreichte innerhalb von 15 Stunden seinen Maximalwert nach 7,5 Tagen mit 12 ng/ μ l Hämolymphe. Von den nachweisbaren Ecdysteroiden war Ecdyson im Peakmaximum mit nur etwa 7 % der Gesamtaktivität im RIA vertreten (Abb. 16). Der Hauptteil der im RIA erfaß-

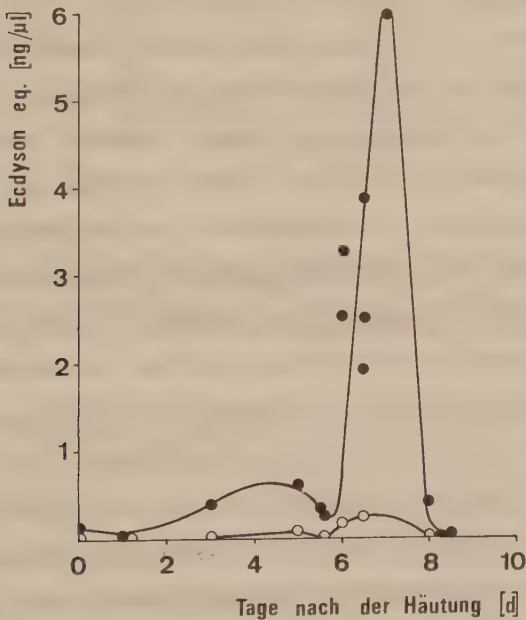


Abb. 16: Titer von Ecdyson (o) und 20-Hydroxyecdysone (●) im fünften Larvalstadium. Messung von Einzeltier-Hämolympheproben nach HPLC-Fraktionierung.

baren Metabolite war 20-Hydroxyecdysen, jedoch war mit der empfindlichen Nachweismethode Ecdysen immer in kleinen Konzentrationen in der Hämolymphe vorhanden. Der Titerverlauf von 20-Hydroxyecdysen entsprach dem der Gesamtecdysteroide, jedoch lag die Summe der Konzentrationen der einzelnen Ecdysteroide nach chromatographischer Fraktionierung erheblich unter der Konzentration der Gesamtecdysteroide in nicht fraktionierten Proben. Wie Ausbeutebestimmungen zeigten, war dies nicht auf Substanzverlust bei der HPLC-Auftrennung zurückzuführen, sondern lag daran, daß im RIA zusätzlich hoch polare, konjugierte Ecdysteroide erfaßt wurden. Durch Hydrolyse mit β -Glucuronidase und Sulphatase aus Schneckensaft von Helix pomatia (Sigma, München) wurde bestätigt, daß es sich bei den hoch polaren Substanzen, die mit dem Antiserum ICT-1 kreuzreagieren, um veresterte Ecdysteroide handelt. Nach chromatographischer Fraktionierung der hydrolisierten Extrakte war die RIA-Aktivität aus der hoch polaren Fraktion verschwunden und trat in der niedrig polaren Fraktion auf, mit der Ecdysen und 20-Hydroxyecdysen eluiert werden. Auf die Konjugate entfielen im Peakmaximum des fünften Stadiums mehr als 50 % der gesamten RIA-Aktivität. Erstaunlicherweise zeigten die Konjugate in Proben, die vor dem Hauptpeak entnommen worden waren, nach der enzymatischen Hydrolyse mehr Aktivität im RIA als die Proben, die zum Zeitpunkt des Peakmaximums gewonnen wurden (Abb. 17).

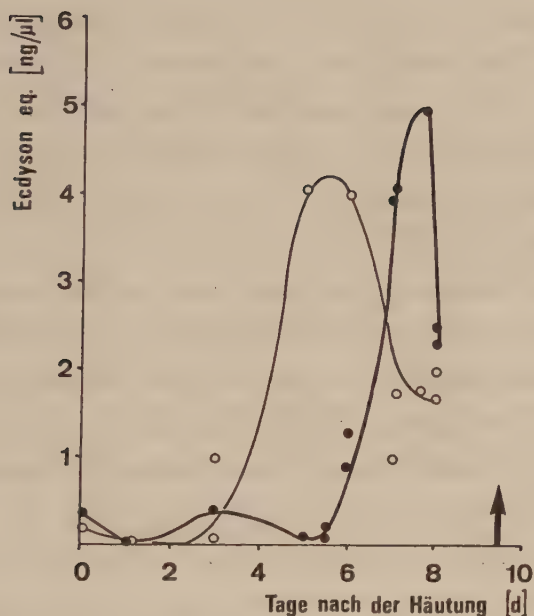


Abb. 17: Titerverlauf von konjugierten Ecdysteroiden im fünften Stadium vor (●) und nach (○) der Hydrolyse mit Schneckensaft von *Helix pom.* Gemessen wurden Einzeltier-Hämolympfproben nach chromatographischer Vorreinigung.

2.2.2. Einfluß von Azadirachtin auf den Titerverlauf der Ecdysteroiden im fünften Larvalstadium

Der Ecdysteroid-Titer in der Hämolymphe wurde bei zwei exakt datierten weiblichen Larven gemessen, denen am ersten Tag nach der Häutung Azadirachtin (2,5 µg/g) injiziert worden war und die beide am Tag 18 beim Versuch, sich zu häuten, gestorben waren. Die Tiere verhielten sich identisch, was den Gewichtsverlauf und die Kutikulabildung betraf. Hämolymphe wurde jeden Tag entnommen und fraktioniert. Die Tiere zeigten einen atypischen Titerverlauf. Erst am Tag 8

stieg die Ecdysteroidkonzentration auf 4 ng/ μ l an. Nach einem Titerabfall war ab Tag 11 ein Anstieg des Titors feststellbar. Das Peakmaximum, das ebenso wie in den Kontrollen bei 12 ng/ μ l lag, wurde am 13. Tag erreicht. Nach weiteren vier Tagen war die Ecdysteroidkonzentration auf einen Minimalwert gesunken, bei dem die adulte Kutikula bereits ausgebildet war und die Larven sich zu häuten versuchten. Beim Häutungsversuch waren noch geringe Ecdysteroidmengen nachweisbar, die ausschließlich aus Konjugaten bestanden. Bemerkenswert ist, daß zwischen dem vierten und sechsten Tag nach Hydrolyse der hoch polaren Fraktionen eine wesentlich höhere RIA-Aktivität festgestellt wurde, als in den nicht hydrolisierten Fraktionen (Abb. 18). Vergleichbare Ergebnisse wurden bei einer weiteren Larve im fünften Stadium erzielt, die 31 Tage nach der Azadirachtin-injektion bei einem Häutungsversuch gestorben war. Bei diesem Tier wurde der Ecdysteroidpeak am 18. Tag nach der Injektion erreicht, zum Häutungszeitpunkt lag der 20-Hydroxyecdysen-Titer wieder unter der Nachweisgrenze. Konjugate waren zum Zeitpunkt der Häutungsversuche in hoher Konzentration vorhanden. Nach der Hydrolyse sank die RIA-Aktivität um die Hälfte. Während am 7. Tag nach der Larvenhäutung (dies entspricht dem Zeitpunkt des Ecdysteroidpeaks bei unbehandelten Larven) keine Ecdysteroiden in der Hämolymphe gemessen wurden, war nach der Hydrolyse der Proben eine hohe RIA-Aktivität vorhanden.

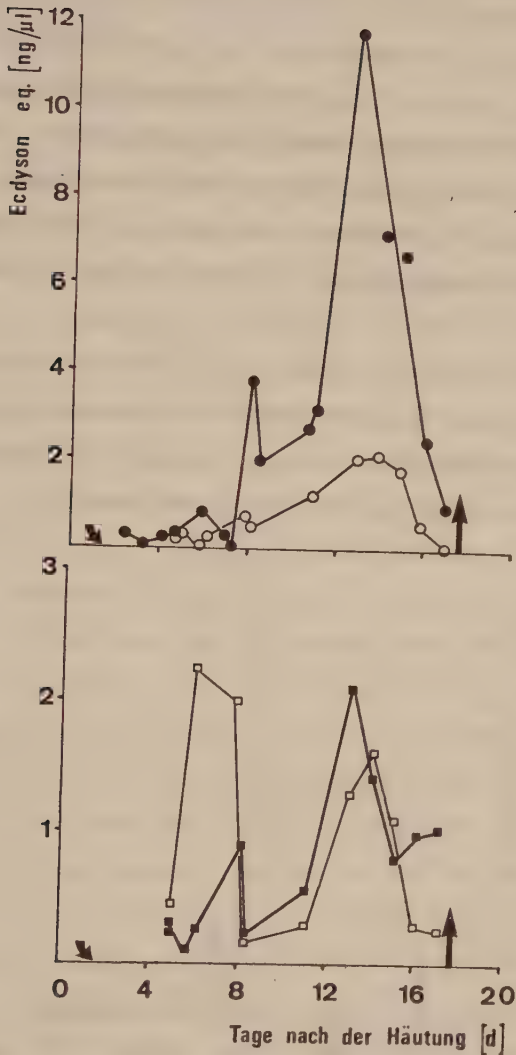


Abb. 18: Ecdysteroid-Titer von Larven (L5), bei denen Azadirachtin (2,5 μ g/g) Häutungshemmung ausgelöst hat. Injektion am ersten Tag nach der Larvenhäutung. $\uparrow$: Häutungsversuch, A: Gesamtecdysteroide (●), Ecdyson und 20-Hydroxyecdysone (○). B: Konjugierte Ecdysteroide (hoch polare Fraktion vor (■) und nach (□) der enzymatischen Hydrolyse mit Schneckenextrakt von *Helix pom.*

Von einer weiteren Larve im fünften Stadium, der am ersten Tag nach der Häutung Azadirachtin ($2,5 \mu\text{g/g}$) injiziert worden war, wurden täglich $10 \mu\text{l}$ Hämolymphe entnommen und der Ecdysteroidgehalt bestimmt (RIA). Die Larve, die an Tag 53 ihres Larvalstadiums getötet wurde, zeigte keine Anzeichen von Kutikulogenese und Häutung. Lediglich in histologischen Präparaten war beginnende oder gehemmte Apolyse sichtbar (siehe Abb. 10).

Der Ecdysteroid-Titer erreichte nie eine für die Kutikula-bildung ausreichende Konzentration. Dem Titeranstieg auf $3,4 \text{ ng Ecdysteroide}/\mu\text{l}$ am 30. Tag folgten vier immer kleiner werdende Peaks bis zum 50. Tag (Abb. 19).

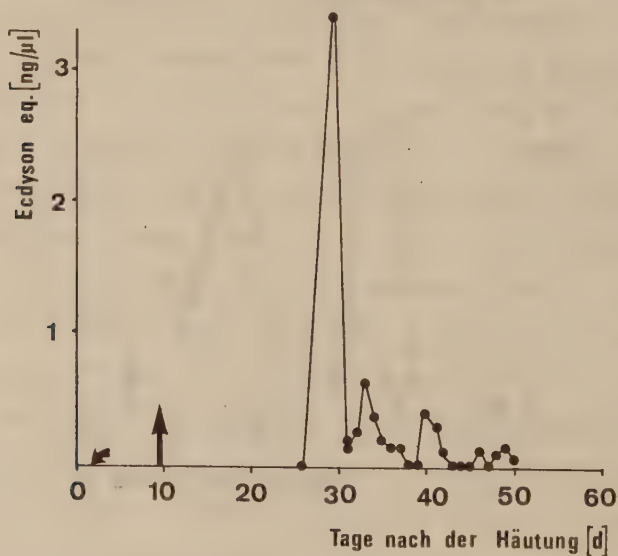


Abb. 19: Ecdysteroid-Titer einer L5, die mit Azadirachtin ($2,5 \mu\text{g/g}$) am ersten Tag nach der Häutung injiziert worden war (▲), ↑: Häutungszeitpunkt von Kontrolltieren.

2.2.3. Abhängigkeit der Azadirachtinwirkung vom Injektionszeitpunkt

2.2.3.1. Viertes Larvalstadium

Das Abstreifen der alten Kutikula beendet das vorausgegangene Larvalstadium. Andere Prozesse wie Apolyse und ihre Induktion sind bereits Tage vorher abgelaufen. Um zu prüfen, in welchen der zeitlich hintereinander ablaufenden Prozesse Azadirachtin eingreift, wurde die Substanz zu verschiedenen Zeitpunkten injiziert. Als Dosis wurde eine Konzentration gewählt, die auch dann im oberen Bereich der Dosis-Wirkungskurve lag ($3,5 \mu\text{g/g}$), wenn die Larven des vierten Stadiums ein höheres Körpergewicht bei spätem Injektionszeitpunkt (ab Tag 3 nach der Häutung) hatten. Unter den gegebenen Aufzuchtbedingungen dauerte das vierte Larvalstadium $6,4 \pm 0,4$ Tage. Der Datierungsfehler lag bei ± 3 Stunden. Pro Zeitpunkt wurden 15 Tiere injiziert. Nach Injektion von Azadirachtin in den ersten beiden Tagen des vierten Stadiums trat der häutungshemmende Effekt bei allen Tieren auf, die Verlängerung der Stadiendauer betrug z.T. mehr als 25 Tage. Larven, die am dritten Tag und später injiziert worden waren, beendeten nach 6,4 Tagen das Stadium mit einer normalen Häutung (Abb. 20). Typische, von Azadirachtin hervorgerufene Effekte traten bei diesen Tieren im nächsten, dem fünften Stadium auf. Nur 14 % der Larven konnten sich zu normalen Adulten häuten, 52 % der Tiere starben als L5 ohne Häutung. Der die Häutung hemmende Effekt kommt demnach nur dann zum Tragen, wenn Azadirach-

tin zu Beginn des Stadiums injiziert wurde. Die Häutungshemmung ließ sich nur während eines überraschend kurzen Zeitraumes induzieren. Innerhalb von 24 Stunden fiel am dritten Tag der Prozentsatz der Inhibition von 100 % auf 10 % ab.

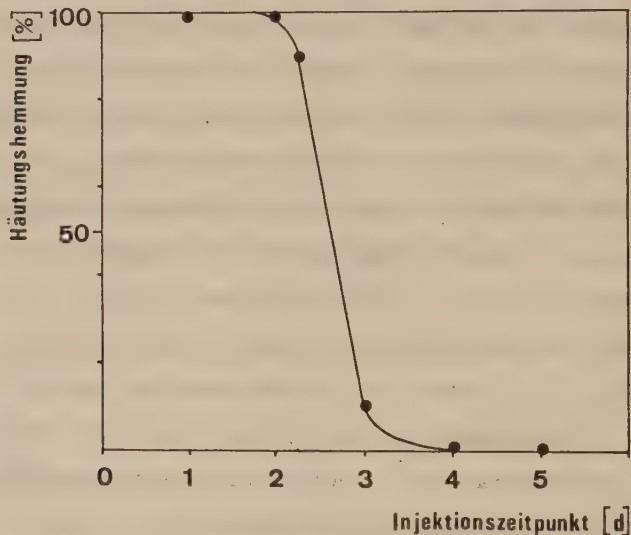


Abb. 20: Wirkung von Azadirachtin auf die Larven-Larvenhäutung in Abhängigkeit vom Injektionszeitpunkt. Es wurden jeweils 15 Tiere mit 3 - 5 μg Azadirachtin/g injiziert und der Prozentsatz der Larven mit Häutungshemmung nach zeitlich verlängertem Stadium bestimmt.

Die unterschiedliche Wirkung von Azadirachtin zu Beginn (Tag 1 und 2) und gegen Ende (Tag 3 und 4) des Larvalstadiums ist nicht dosisabhängig. Larven des vierten Stadiums reagierten auf eine Erhöhung der Azadirachtindosis ohne Einfluß auf Häutung und Stadiendauer, sofern die Injektion

spät erfolgte. Dagegen führte die Injektion einer steigenden Azadirachtindosis in den ersten beiden Tagen zu einer zeitlichen Verlängerung des Stadiums (Abb. 21).

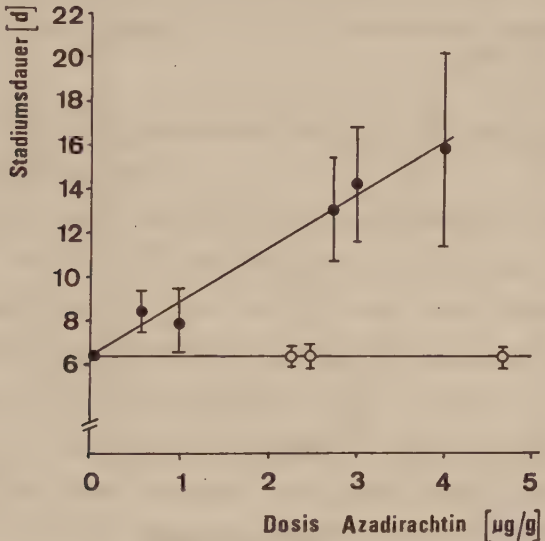


Abb. 21: Abhängigkeit der Häutungshemmung und der Stadiendauer vom Injektionszeitpunkt und der Azadirachtindosis bei Larven des vierten Stadiums. ●: Injektion an Tag 1 oder 2 nach der Häutung. ○: Injektion an Tag 3 oder 4 nach der Häutung. Vertikale Linien geben die Standardabweichung der Stadiendauer in den jeweiligen Populationen (n = 15) an.

2.2.3.2. Fünftes Larvalstadium

Gleiche Experimente mit Larven des fünften Stadiums führten zu ähnlichen Ergebnissen wie beim vierten Stadium. Gruppen mit mindestens zehn Larven wurden zu unterschiedlichen Zeiten 1,1 µg Azadirachtin injiziert, was je nach Körpergewicht einer Dosis von 1,1 - 2 µg/g entspricht. Der Verlust der Sensitivität auf Azadirachtin war jedoch nicht

innerhalb von 24 Stunden zu beobachten, sondern er erstreckte sich über einen Zeitraum von zwei bis drei Tagen (Abb. 22).

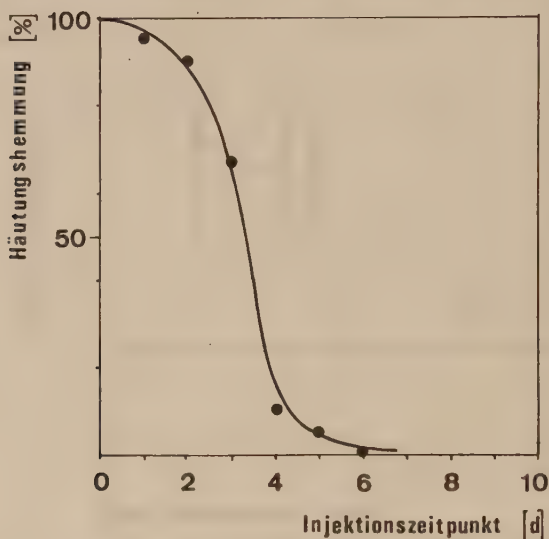


Abb. 22: Wirkung von Azadirachtin auf die Larven-Adult-häutung in Abhängigkeit vom Injektionszeitpunkt. Es wurden jeweils 10 Tiere mit 1,1 - 2 μ g Azadirachtin/g injiziert und der Prozentsatz der Larven mit Häutungshemmung und zeitlich verlängertem Stadium bestimmt.

Die Gewichtszunahme innerhalb des Stadiums und die dadurch bedingte Erniedrigung der Azadirachtindosis bei gleichbleibender Injektionsmenge war nicht die Ursache für eine erfolgreiche Häutung bei Larven, die am vierten Tag und später injiziert worden waren. Bei Injektion höherer Dosen häuteten sich die Tiere normal, wenn Azadirachtin später als vier Tage nach der Häutung injiziert worden war. Auch

die Dosis von 2,1 µg/g konnte im fünften Larvalstadium die Adulthäutung am 10. Tag nicht hemmen, wenn sie am vierten Tag des Stadiums injiziert worden war. Allerdings war die Sterblichkeit dieser Tiere nach erfolgreicher Larven-Adulthäutung äußerst hoch.

2.2.4. Effekt von Gehirnhomogenat auf mit Azadirachtin behandelte Larven

Der Ecdysteroid-Titer steigt in den Larven des vierten und fünften Stadiums zu einem Zeitpunkt an, an dem die Häutung durch Injektion von Azadirachtin nicht mehr gehemmt werden kann. Eine normale Häutung auch bei Injektion hoher Azadirachtindosen ab Tag 3 (viertes Stadium) bzw. Tag 4 (fünftens Stadium) ist ein Hinweis darauf, daß die Induktion der Ecdysonbiosynthese nur dann blockiert wird, wenn der induzierende Faktor (Prothoracotropes Hormon, PTTH) fehlt, oder seine Freisetzung aus dem Gehirn in die Hämolymphe gehemmt ist.

Eine mögliche Hemmung der Freisetzung wurde untersucht, indem Larven des vierten Stadiums, denen am Tag 2 Azadirachtin (4,5 µg/g) injiziert worden war, 24 Stunden später (Tag 3) Gehirnhomogenat erhielten. Gehirne wurden solchen Larven des vierten Stadiums am dritten Tag nach der Häutung entnommen, denen 24 Stunden zuvor Azadirachtin (4,5 µg/g) injiziert worden war. Von 15 Versuchstieren häuteten sich zwei Larven zu normalen L5, eine Larve versuchte sich

zu häuten, vermochte allerdings die Exuvie nicht vollständig abzustreifen. Die larvale Ausprägung war jedoch eindeutig. Dies deutet darauf hin, daß im Homogenat Faktoren enthalten sind, die trotz der hohen Azadirachtindosis Häutungsprozesse auslösen können.

3. Wirkung des Azadirachtins auf adulte Weibchen

3.1. Wirkung auf Körpergewicht und Mortalität

Ebenso wie bei den Larven wurde zunächst der Einfluß von Azadirachtin auf Körpergewicht und Fraßverhalten untersucht. Jeweils verschieden hohe Dosen Azadirachtin wurden vier Tage nach der letzten Larven-Adulthäutung in Weibchen injiziert. Die Gewichtsveränderung bis zur ersten Eiablage und die Sterblichkeitsrate wurden täglich bestimmt. Die eingesetzte Dosis lag zwischen 0,4 und 7 $\mu\text{g/g}$; Kontrollen wurden verschiedene Mengen 90%iges Ethanol injiziert (2; 5; 8 μl). Mindestens 10 Tiere wurden pro Dosis untersucht. Ab einer Dosis von 2 $\mu\text{g/g}$ bewirkte Azadirachtin einen Gewichtsverlust der Tiere, der sich weiter mit zunehmender Dosis verstärkte und bei einer Dosis von etwa 4 $\mu\text{g/g}$ einen maximalen Gewichtsverlust erreichte (Abb. 23). Wie bei Larven führt eine höhere Dosis auch bei Adulten zu erhöhter Sterblichkeit innerhalb des ersten Eiablagezyclus (Abb. 24). Der größte Anstieg in der Mortalitätsrate liegt zwischen 2 und 3 $\mu\text{g/g}$, einer Dosis, bei der die Tiere auch an Körpergewicht zu verlieren beginnen.

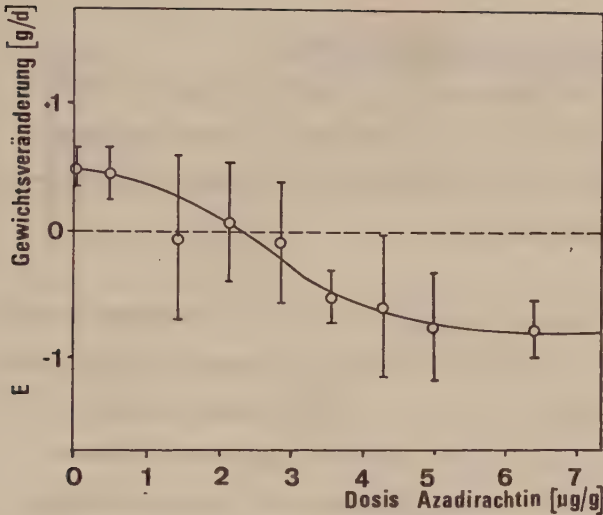


Abb. 23: Einfluß des Azadirachtins auf das Körpergewicht adulter Weibchen ($n = 10$ Tiere/Dosis). Injektion am vierten Tag nach der Adulthäutung. Das Körpergewicht der Tiere wurde an den darauffolgenden Tagen bestimmt und der Gewichtsanstieg oder -verlust jedes Tieres als Steigung der Regressionsgeraden ausgedrückt. Angegeben ist der Mittelwert der Steigungen jeder Population (o-o) mit Standardabweichung.

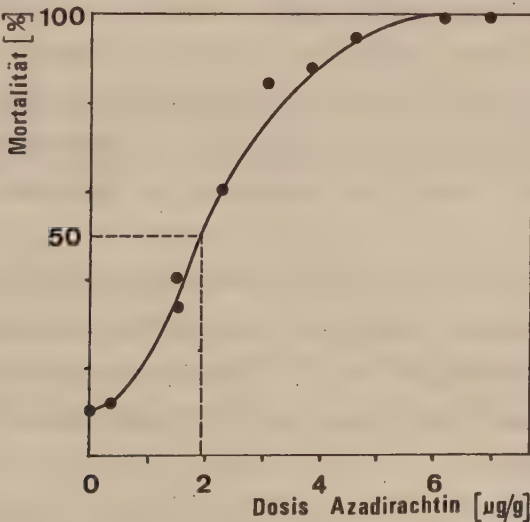


Abb. 24: Einfluß der Azadirachtindosis auf die Mortalität adulter Locustaweibchen ($n = 10$ Tiere/Dosis) innerhalb des ersten Eireifungszyklus. Injektionszeitpunkt: vier Tage nach der Adulthäutung.

3.2. Wirkung auf die Nahrungsaufnahme

Ebenso wie bei den Larven bewirkt Azadirachtin bei Adulten einen starken Gewichtsverlust. Es war die Frage zu klären, ob der Gewichtsverlust eine Folge von Fraßhemmung oder gesteigerter Ausscheidung ist.

Einer homogenen Population ($n = 30$) adulter Weibchen wurde Azadirachtin ($2,6 \mu\text{g/g}$) injiziert. Den Kontrolltieren wurde $6 \mu\text{l}$ 90%iges Ethanol injiziert, anschließend wurden sie 96 Stunden lang ohne Futter gehalten. Die Tiere bekamen täglich Wasser in Petrischalen angeboten. Die Faecesmenge und das Körpergewicht wurden täglich bestimmt. Tote Tiere wurden alle 4 Stunden entfernt, um Kannibalismus zu vermeiden. Für Versuche, die später beschrieben werden, wurde zusätzlich allen Tieren mindestens eine Hämolympheprobe entnommen, um die Proteinkonzentration und den Vitellogenin-gehalt zu bestimmen. Sowohl bei den mit Azadirachtin behandelten Tieren als auch bei Hungertieren wurde außerdem am Ende des Experiments die Eientwicklung im Ovar untersucht. Das Gewicht der Tiere, denen Azadirachtin appliziert worden war, nahm in der gleichen Weise wie das der Hungertiere ab (Abb. 25). Gleichzeitig war in beiden Populationen eine starke Reduktion der täglich ausgeschiedenen Faecesmenge pro Tier zu beobachten (Abb. 26). Daraus kann geschlossen werden, daß Azadirachtin auch bei adulten Weibchen Fraßhemmung auslöst.

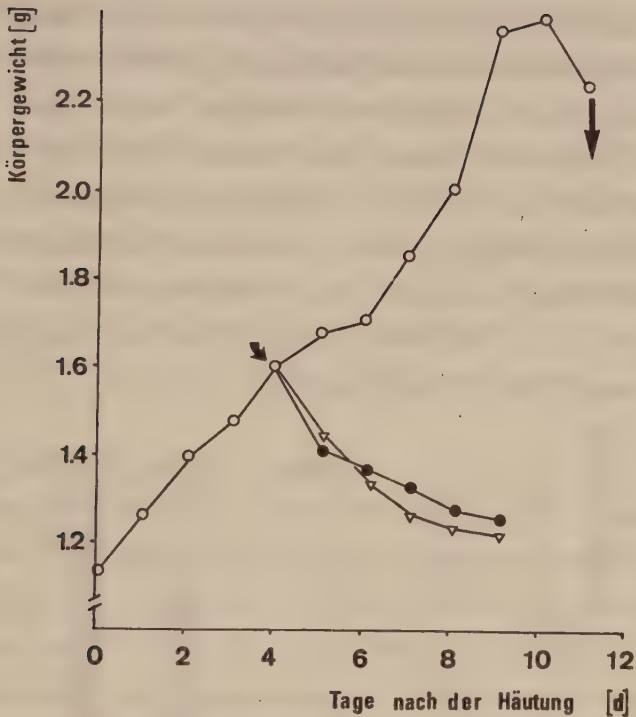


Abb. 25: Wirkung von Azadirachtin und Futterentzug auf das Körpergewicht adulter Weibchen ($n = 30$). O: mit Ethanol behandelte Kontrollen, ▽: Kontrollen, denen kein Futter angeboten wurde, ●: mit Azadirachtin injizierte Weibchen ($2,6 \mu\text{g/g}$), ↓: Eiablage der Kontrolltiere.

Zwei Unterschiede zwischen Futterentzug und Fraßhemmung waren jedoch zu verzeichnen: Die Ausscheidungen nahmen bei den mit Azadirachtin behandelten Tieren nur allmählich ab, während die Menge der Faeces bei hungernden Tieren rasch auf einen konstanten Wert von ca. 3 % der Kontrolle sank. Zusätzlich deutete die Tatsache, daß der ausgeschiedene Kot bei Hungertieren fast ausschließlich aus Trocken-

substanz bestand, darauf hin, daß bei *Locusta* die Physiologie der Folgeaktionen von Fraßhemmung und Futterentzug unterschiedlich ist. Andere Untersuchungen zeigten ebenfalls, daß Hungertiere nahezu keine Körperflüssigkeit verlieren (Lim und Lee, 1981). Mit Azadirachtin behandelte Tiere scheiden Faeces mit einem im Vergleich zu Hungertieren beträchtlichen Wasseranteil aus (mehr als 10 % des Frischgewichts), so daß möglicherweise darauf der hohe Verlust von Hämolymphe zurückzuführen ist.

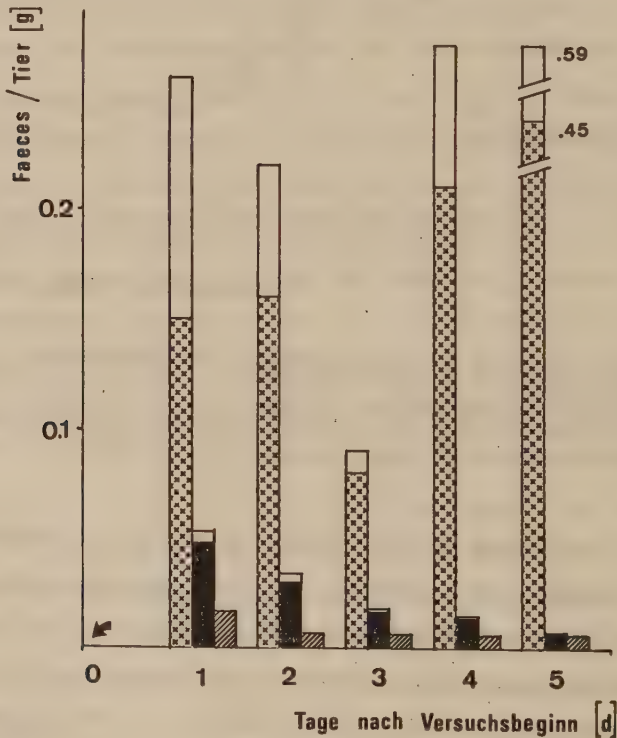


Abb. 26: Faecesbestimmung von Weibchen nach Azadirachtin-injektion (2,6 µg/g) und von Hungertieren. : Wasseranteil in den Faeces. : mit Ethanol injizierte Kontrollen. : mit Azadirachtin injizierte Weibchen. : Hungertiere. Zum Injektionszeitpunkt und Gewichtsverlauf der Tiere siehe Abb. 25

Untersuchungen der Ovarien von Hungertieren ergaben eine vollständige Hemmung der Eireifung. Die Ovarien waren meist weiß und nicht entwickelt. Futterentzug zu einem Zeitpunkt während der Eireifung (in der vorliegenden Arbeit nicht aufgeführte Experimente) führte zu starker Resorption der bereits in die Oozyten eingelagerten Stoffe. Die Oozyten waren aufgelöst, es bildeten sich orange-gelbe Residualkörper. Zur Wirkung von Azadirachtin auf die Oogenese wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

3.3. Wirkung auf die Oogenese

Das Gewicht geschlechtsreifer Weibchen wird in starkem Masse durch die Ovarien und die sich darin entwickelnden Eier bestimmt. Bei ablagebereiten Tieren beträgt das Gewicht der Ovarien etwa 20 % des Gesamtgewichts. Die beobachtete Gewichtsabnahme nach Behandlung mit Azadirachtin konnte somit auch in der Hemmung der Ovarienentwicklung begründet sein. Der Einfluß von Azadirachtin auf die Eientwicklung fand daher in der vorliegenden Arbeit gesonderte Beachtung.

Ohne Einfluß auf den Gewichtszuwachs wurde nach Injektion von Azadirachtin (0,3 µg/g) der erste Eireifungszyklus verlängert. Der Zeitpunkt der Eiablage verzögerte sich bei später Injektion; die Ablage erfolgte normal und auch die Sterblichkeit gegenüber den Kontrollen war nicht erhöht (Abb. 27). Die Minimaldosis, bei der in *Locusta* gerade ein

physiologischer Effekt hervorgerufen werden kann, liegt demnach bei $0,3 \mu\text{g}$ Azadirachtin/g.

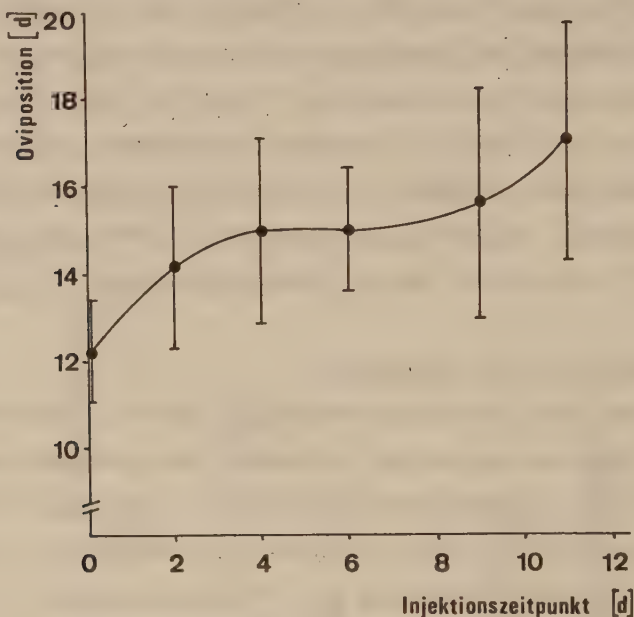


Abb. 27: Zeitpunkt der Eiablage in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Azadirachtininjektion bei konstanter Dosis ($0,3 \mu\text{g/g}$). Die vertikalen Linien geben die Standardabweichung des Ablagezeitpunkts an ($n = 10$ Tiere/Injektionszeitpunkt).

Die hemmende Wirkung von Azadirachtin auf die Oogenese war bei höherer Dosierung stärker ausgeprägt, wie Untersuchungen der Ovarien injizierter Weibchen ergaben. Während die Oozyten bei niedrigen Azadirachtindosen zur ablagereifen Größe wuchsen, war die Oogenese bei Azadirachtindosen ab $5 \mu\text{g/g}$ völlig inhibiert (Abb. 28). Die Oozyten waren meist weiß und nie größer als $1,5 \text{ mm}$ (Länge der terminalen Oozyten, LTO). Auch nach 18 Tagen, einem Zeitraum, in dem Kon-

trolltiere bereits abgelegt hatten, war kein Eiwachstum feststellbar (Abb. 24).

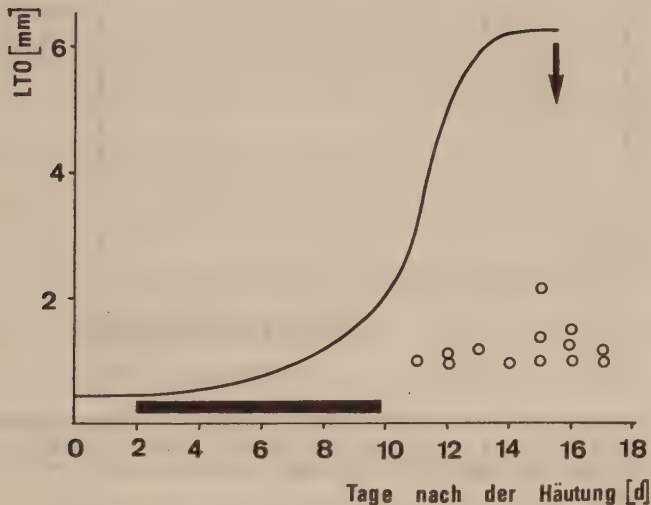


Abb. 28: Hemmung des Oozytenwachstums nach Azadirachtin-injektion (5 - 7 $\mu\text{g/g}$). Die ausgezogene Linie beschreibt die Größenzunahme von Oozyten unbehandelter Weibchen. o: Ovarien von mit Azadirachtin behandelten Weibchen. : Injektionszeitraum. ↓: Eiablage der Kontrolltiere.

Mit Azadirachtin behandelte Weibchen legten weniger Eipakete ab. Mit steigender Dosis sank der Prozentsatz fortpflanzungsfähiger Weibchen. Bereits bei 4 $\mu\text{g/g}$ war die Eiablage völlig gehemmt (Abb. 29). Der Zustand der Ovarien deutete auf unterschiedliche Ursachen für die nicht erfolgte Eiablage hin.

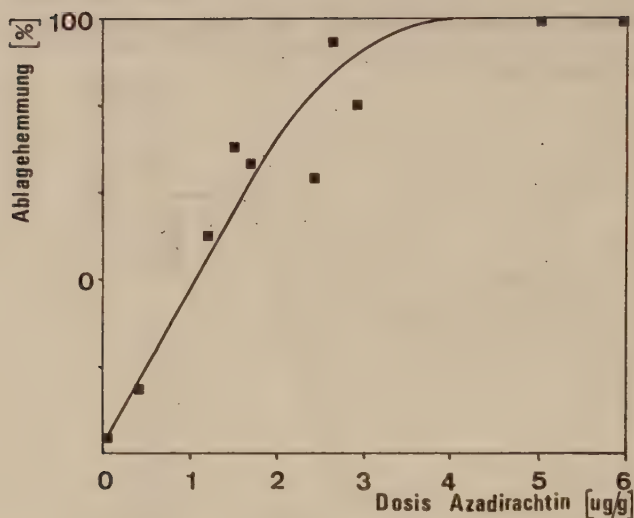


Abb. 29: Hemmung der Eiablage nach dem ersten Eireifungszyklus in Abhängigkeit von der Azadirachtindosis. Die Injektion erfolgte am vierten Tag nach der Häutung (n = 15 Tiere/Dosis).

3.3.1. Wirkung von Azadirachtin auf Konzentration von Hämolympheproteinen

In folgendem Experiment wurde die Proteinkonzentration in der Hämolymphe von Weibchen mit fehlender Eireifung untersucht. Eine erniedrigte Konzentration diente als Maß für die Aktivität der Proteinsynthese, da der Einbau von Eidotterproteinen in die terminalen Oozyten gleichzeitig gehemmt war. Adulten Weibchen, denen am vierten Tag nach der Häutung jeweils verschiedene Dosen Azadirachtin injiziert worden waren, wurden täglich 10 µl Hämolymphe entnommen und das Protein nach Lowry et al. (1951) bestimmt. Der Verlauf des Proteintiters in den mit Ethanol behandelten Kontrollen

stieg zwischen Tag 6 und Tag 11 um das dreifache an. In der Phase des darauffolgenden massiven Einbaus von Vitellogenin in die Oozyten (3,5 - 6 mm LTO), fiel der Proteintiter wieder auf Werte wie während der Prävitellogenese. Die Erhöhung des Proteingehalts in der Hämolymphe wird durch einen Titeranstieg von Vitellogenin verursacht, dem ein schneller Titerabfall ab Tag 11 folgt (Gellissen und Emmerich, 1978). Der Lipophorinanteil in der Hämolymphe bleibt über den gesamten Zyklus konstant (Ferez 1978; Harry et al., 1979). Der Titeranstieg der Hämolympheproteine von behandelten Tieren war bei niederen Dosen (bis 2,4 µg/g) nicht so ausgeprägt und wurde bei höheren Azadirachtindosen vollständig unterdrückt. Bei Weibchen, denen Azadirachtin (2,4 µg/g) injiziert worden war, stieg gegen Ende des Zyklus, ab Tag 15, die Proteinkonzentration an. Tatsächlich war bei manchen Tieren verspätete Eiablage noch möglich, aber auch die Weibchen, die ohne Eiablage starben, hatten Ovarien mit terminalen Oozyten zwischen 3 und 6 mm Länge. Bei Titerbestimmungen von Hämolymphe aus Weibchen, denen hohe Azadirachtindosen injiziert worden waren, lag die Proteinkonzentration konstant niedrig (Abb. 30).

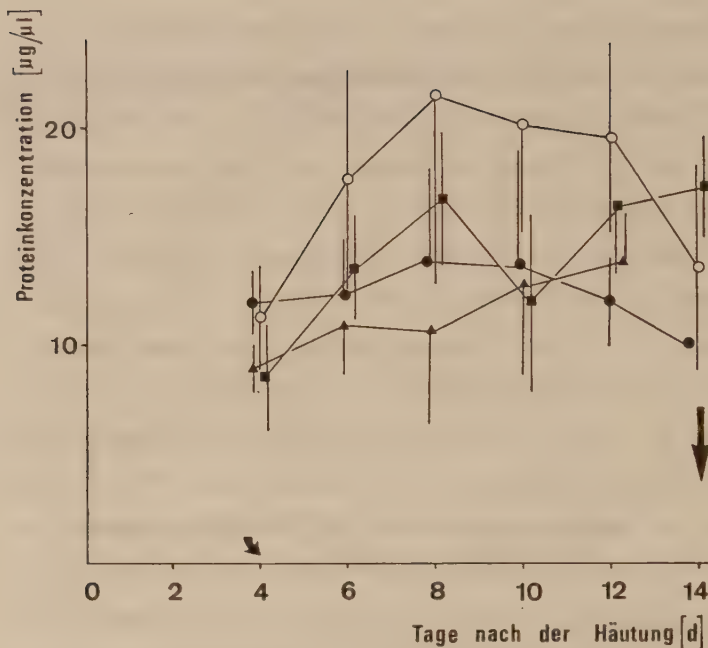


Abb. 30: Hämolympfproteinkonzentration von Weibchen im ersten Eireifungszyklus nach Azadirachtininjektion (n = 10 Tiere/Dosis). Kontrollen wurde 5 - 8 µl Ethanol injiziert (○). Population mit 2,4 µg/g (■), mit 3,4 µg/g (●), mit 5 µg/g (▲). Vertikale Linien geben die Standardabweichung der Mittelwerte an.

3.2.2. Einfluß des Azadirachtins auf die Vitellogenin-Konzentration

Adulten Locustaweibchen, denen fünf Tage nach der Häutung Azadirachtin (3,5 µg/g) injiziert worden war, wurde Hämolymphe zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion entnommen und die Proteine elektrophoretisch bestimmt. Bei dieser Azadirachtindosis war eine vollständige Hemmung der Eireifung zu erwarten.

10 Tage nach Injektion wurden die Tiere getötet und die Ovarien untersucht. Bei keinem Weibchen wurde Eiwachstum festgestellt; die Ovarien waren weiß, die terminalen Oozyten waren weniger als 1 mm lang. Die Hämolympheproteine von diesen Weibchen wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und mit denen von Kontrolltieren verglichen, die sich in der Phase der Vitellogenese befanden (Hämolymp-Entnahme zwischen Tag 9 und 12 bei Ablage am Tag 14). Die Identifizierung von Vitellogenin war durch das charakteristische Bandenmuster seiner sechs Untereinheiten (Molekulargewichte 110 000 d, 102 000 d, 96 000 d, 92 000 d, 55 000 d, 50 000 d) auf den Gelen möglich. Zusätzlich wurde Hämolymphe von Kontrolltieren mit Anti-Vitellogenin-Antiserum inkubiert und das gebundene Vitellogenin nach Fällung mit Protein-A-Sepharose elektrophoretisch eindeutig nachgewiesen. Während Hämolymphe von Kontrolltieren immer die Banden der Vitellogenin-Monomere neben Lipophorin zeigten, fehlten sie bei den mit Azadirachtin behandelten Tieren, oder waren nur sehr schwach ausgeprägt (Abb. 31). Weibchen, die vier Tage lang gehungert hatten, wiesen ebenfalls kein oder nur wenig Vitellogenin bei gleichzeitiger Hemmung des Oozytenwachstums auf. Der Proteintiter von Kontrollweibchen sank in diesem Experiment geringfügig auf etwa 15 µg/µl nach vier Tagen ohne Nahrung. Die Änderung im Hämolymp-Proteintiter von Hungertieren und mit Azadirachtin behandelten Tieren blieb auf die Hemmung von Vitellogenin beschränkt, während die Konzentration von Lipophorin sich nicht wesentlich änderte.

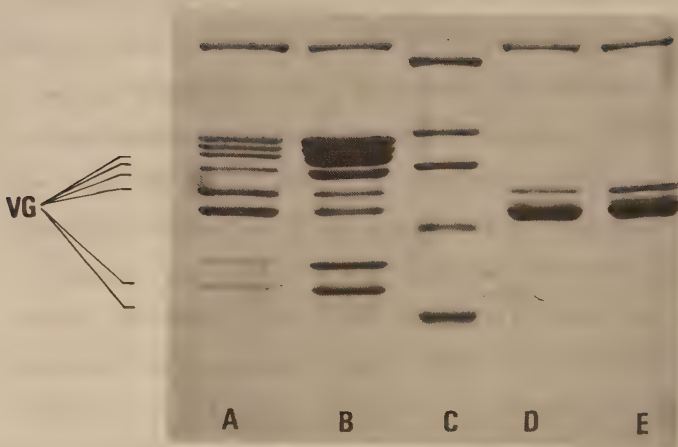


Abb. 31: Hemmung der Vitellogenese nach Azadirachtininjektion in adulten Weibchen vier Tage nach der Häutung und bei Weibchen nach Futterentzug. SDS-PAGE von Hämolympboproteinen (40 µg/Probe) im Gradientengel (7 - 12 %). A,B: Hämolympboprobe von unbehandelten Weibchen (Tag 8), C: Standard (200,000; 116,500; 94,000; 64,000; 43,000), D: Weibchen nach Azadirachtin-Behandlung (Tag 9), E: Weibchen nach drei Tagen Hunger.

3.3.3. Morphologisches Bild der Oogenesehemmung

Während bei einer Minimaldosis von Azadirachtin (0,4 µg/g) die Oozyten normal reiften und abgelegt wurden, wurde ab 3 µg/g die Eiablage vollständig gehemmt. Die ED_{50} lag bei etwa 1,3 µg Azadirachtin/g. Bei dieser Dosis wurde die Eireifung initiiert, die terminalen Oozyten nahmen Vitellogenin auf und nahmen auch an Länge zu. Es fiel jedoch auf, daß die Größenzunahme der Oozyten nicht mehr mit dem Körpergewicht der Weibchen korreliert war. So besaßen Weib-

chen mit einem Körpergewicht von 1,1 g Oozyten mit 6,2 mm LTO, während Normaltiere am Ende der Eireifung bis zu 3 g wogen. Nach Hunger war bei bereits begonnener Vitellogenese durch Körpergewichtsverlust keine Eireifung möglich, die Oozyten wurden weitgehend resorbiert. Auch war die Störung der Oogenese individuell sehr unterschiedlich. Oft verblieben einige Oozyten nach der Oviposition im Ovar oder im Eileiter, oder es wurden nur Oozyten aus der linken oder rechten Hälfte des Ovars abgelegt; im Ovar verbleibende Oozyten wurden nicht resorbiert. Auch konnte die Oozytenlänge innerhalb eines Ovars stark schwanken. Während die kaudal gelegenen Oozyten bereits bis 3 mm lang sind, sind rostral gelegene Oozyten in der Prävitellogenese (1 mm) noch völlig weiß. Oozyten von Weibchen, denen Azadirachtin in der späten Vitellogenese injiziert worden war, waren zum Teil völlig transparent und klar (LTO 6,5 mm), ohne daß in der Proteinkonzentration (2,1 mg/Oozyte) oder in der Vitellinmenge Unterschiede zu Kontrolloozyten gefunden wurden. Histologische Präparate von nicht entwickelten Ovarien aus Weibchen mit 2,5 µg/g Azadirachtin wiesen unter dem Lichtmikroskop (Azan-Färbung) keine zelluläre Schädigung von Follikelzellen oder Oozyten auf.

3.4. Wirkung auf den Ecdysteroidtiter im Ovar

Nachdem bereits die Wirkung des Azadirachtins auf die Ausbildung des Ecdysteroidtiters bei Larven nachgewiesen werden konnte, sollte im folgenden Experiment untersucht werden, ob Azadirachtin auch die Synthese von Ecdysteroiden

in reifenden Ovarien adulter Weibchen hemmt. Die Synthesorte von Ecdyson sind die Follikelzellen im Ovar (Goltzene et al., 1978). Die Prothoraxdrüsen (PTG) sind im adulten Stadium inaktiviert.

3.4.1. Injektion von Azadirachtin während der Vitellogenese

Adulten Weibchen ($n = 35$) wurde zwischen Tag 9 und 14 nach der Häutung Azadirachtin ($5 - 8 \mu\text{g/g}$) injiziert. In diesem Zeitraum erreichten die Oozyten eine Länge von $3 - 5 \text{ mm}$. 9 % der Versuchstiere legten 2 - 3 Tage nach der Injektion Eier. Der Eireifungszyklus von Kontrollen ($10 \mu\text{l}$ Ethanol) dauerte 14 bis 16 Tage.

Bei dieser Dosis war die Mortalität stark erhöht. Vor Eintritt des Todes wurden die Ovarien für die Hormonbestimmung herauspräpariert. Die Oozytenlänge von Ovarien bereits toter Tiere wurde gemessen; zur Hormonbestimmung wurden sie nicht herangezogen. Ovarien der Testtiere und von Kontrolltieren, die kurz vor der Eiablage waren, wurden herauspräpariert und die Länge der Oozyten bestimmt. Anschließend wurden die Ovarien bis zur weiteren Titerbestimmung tiefgefroren. Das Wachstum der terminalen Oozyten war bei den mit Azadirachtin behandelten Tieren normal; die meisten Ovarien besaßen Oozyten mit einer Länge von $6 - 6,2 \text{ mm}$. Azadirachtin hemmte demnach das Wachstum der Oozyten ab etwa 4 mm Länge nicht mehr, auch wenn es in hohen Dosen injiziert worden war. Dies konnte aus dem Körpergewicht ($1,8 \text{ g}$) an Tag 10 (Injektionszeitpunkt) geschlossen werden,

bei dem Kontrolltiere Oozyten bis etwa 4 mm Länge entwickelt hatten. Die Ovarien waren kleiner (158 ± 87 mg FG) als die von Kontrollen (339 ± 79 mg), wahrscheinlich bedingt durch eine vollständige Resorption von Oozyten ohne sichtbare Residualkörper. Die Ecdysteroidkonzentration wurde nach Homogenisieren und Extraktion der Ovarien mittels Radioimmunoassay (Borst und O'Connor, 1974) bestimmt.

In Ovarien von Kontrolltieren stieg mit zunehmender Oozytenlänge der Ecdysteroidgehalt zwischen dem 11. und dem 14. Tag sehr schnell an. Innerhalb von 24 Stunden erreichte die Konzentration bereits den Maximalwert von etwa $20 \mu\text{g/Ovar}$. Hingegen war in Ovarien behandelter Tiere mit gleicher Eilänge ein Titeranstieg nicht festzustellen (Abb. 32,33), vielmehr blieb die Ecdysteroidkonzentration mit $6 \pm 4,35$ ng/mg Ovar ($n = 10$) vergleichsweise gering (Kontroll ovarien: $27,9 \pm 15,6$ ng/mg Ovar, $n = 10$). Da zum Injektionszeitpunkt der Entwicklungszustand der Tiere aufgrund des Körpergewichts nur geschätzt werden konnte, bestand die Möglichkeit, daß die in den Ovarien behandelten Weibchen gemessene Ecdysteroidmenge bereits vor dem Zeitpunkt der Injektion synthetisiert worden war. Ecdysteroide lassen sich immunohistochemisch in den Follikelzellen und in den terminalen Oozyten durch Fluoreszenz nachweisen. Bereits bei einer Oozytenlänge von 3,5 mm konnten Ecdysteroide durch Immunofluoreszenz auf Gefrierschnitten lokalisiert werden (Abb. 34). Etwas geringere Fluoreszenz im Oozytenlumen deutet bereits in diesem Stadium und auch

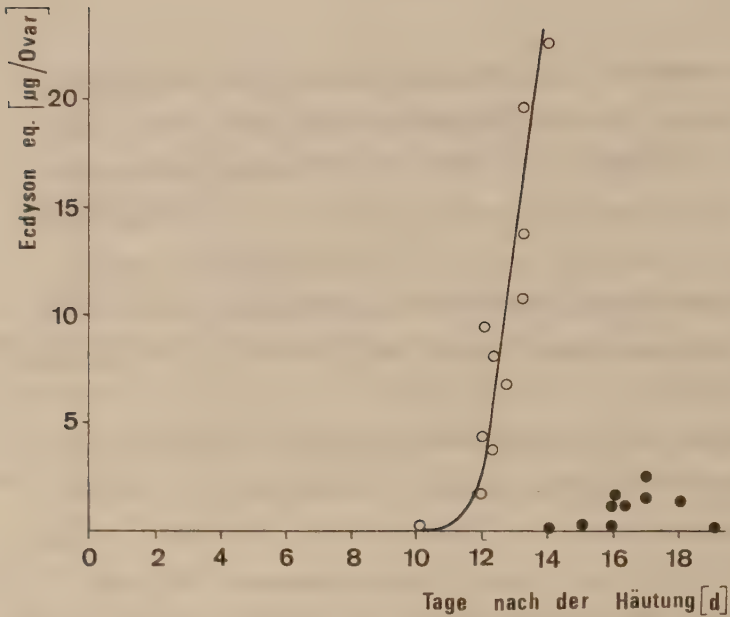


Abb. 32: Ecdysteroidgehalt der Ovarien von Weibchen nach Injektion von Azadirachtin (5 µg/g) 9 bis 12 Tage nach der Häutung (●) und von Kontrollen, die mit 10 µl EtOH (90 %) injiziert wurden (o). Die Meßpunkte stellen Einzelmessungen dar (RIA).

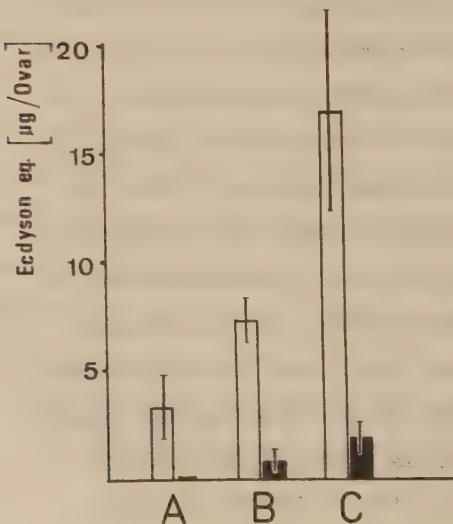


Abb. 33: Ecdysteroidgehalt der Ovarien in verschiedenen Entwicklungsphasen der Oozyten, ausgedrückt in LTO (Länge der terminalen Oozyten). Pro Entwicklungsphase wurde der Hormongehalt von vier Ovarien bestimmt. Vertikale Linien geben die Standardabweichung an.
A: 5,0 - 5,4 mm LTO;
B: 5,5 - 6,9 mm LTO;
C: 6,2 mm LTO.

■: Weibchen, denen Azadirachtin (5 µg/g) injiziert worden war.
□: Kontrollen, denen 10 µl EtOH injiziert worden war. Injektion 9 - 12 Tage nach der Adulthäutung.

bei weiter fortgeschrittener Oogenese auf Einbau von Substanzen hin, die mit dem Ecdyson-Antiserum reagieren. Mit Normalkaninchenserum behandelte Präparate fluoreszieren ebenfalls, doch ist die Fluoreszenz bedeutend schwächer ausgeprägt. Ebenso ist die starke Fluoreszenz des Chorions unspezifisch (Glass et al., 1978).

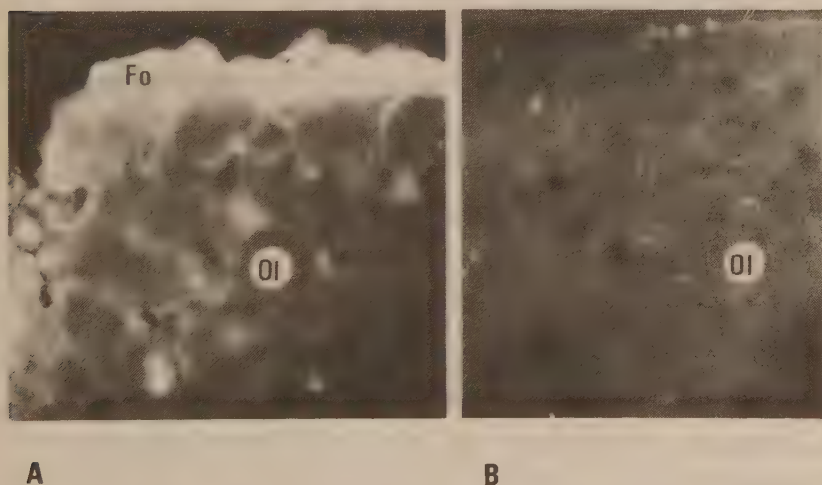


Abb. 34: Gefrierschnitte ($30\ \mu$) von terminalen Follikeln (LTO: 3,5 mm) von *L. migratoria*. Immunofluoreszenz nach Inkubation mit dem Ecdysteroid-Antikörper und Markierung mit FITC markiertem Ziegen-anti-Hasen-Antikörper (A). Mit Normal-Kaninchenserum inkubierte Kontroll-Oozyte (5,5 mm LTO) (B). FO: Follikelzellen, Ol: Oozytenlumen.

3.4.2. Injektion von Azadirachtin vor der Vitellogenese

Azadirachtin ($2,5\ \mu\text{g/g}$), am vierten Tag nach der Larven-Adulthäutung injiziert, schädigt die Oogenese schwer. Die Tiere vollenden aber vereinzelt die Oogenese trotz stark erniedrigtem Körpergewicht. Azadirachtin führt in dieser geringen Dosierung zu reduzierten Ecdysteroidkonzentrationen

in Oozyten mit einer Länge von 6,3 mm. Für eine exakte Bestimmung des Ecdysteroidgehalts wurden einzeln herauspräparierte Oozyten untersucht. Jeweils 30 Oozyten aus einem Ovar wurden homogenisiert, gewogen und die Hormonkonzentration untersucht. Legereife Oozyten von Kontrolltieren wogen $6,5 \pm 0,28$ mg, während Oozyten der gleichen Länge von mit Azadirachtin behandelten Weibchen etwas leichter waren (5,7 mg). Bestimmt wurde jeweils der Ecdysteroidgehalt in Oozyten von vier Tieren pro Gruppe. Die Resultate spiegeln den raschen Anstieg der Hormonkonzentration gegen Ende der Eireifung wider, hingegen blieb in behandelten Weibchen der Titer niedrig.

Tabelle 2. Einfluß von Azadirachtin auf den Ecdysteroidgehalt von Oozyten verschiedener Entwicklungsphasen (ausgedrückt in LTO). Adulten Weibchen wurde Azadirachtin (2,5 µg/g) vier Tage nach der Häutung injiziert. Jeweils 30 Oozyten wurden für eine Messung (RIA) verwendet.

LTO [mm]	5,0	5,5	6,0	6,3	6,5
Kontroll-Oozyten (ng/Oozyte)	-	35	38	58	533
Oozyten von Weibchen nach Azadirachtin- injektion	0,5	22	-	82	11 14

In diesem Experiment waren bei den mit Azadirachtin behandelten Tieren größere Unterschiede in der Hormonkonzentration der Oozyten verschiedener Individuen zu erwarten, da die Reaktion der Tiere auf eine Azadirachtindosis von 2,5 µg/g, bezogen auf Körpergewicht und Eireifung, uneinheitlich ist.

3.4.3. Embryogenese - Fehlentwicklung nach Injektion von Azadirachtin

Die in den Oozyten vorhandenen Ecdysteroide entfalten ihre Wirkung während der Embryogenese, indem sie Entwicklungsvorgänge wie die Kutikulogenese kontrollieren (Hoffmann et al., 1980). Eier von Weibchen, denen Azadirachtin injiziert worden war, entwickelten sich nach der Ablage nicht oder benötigten etwa doppelt so lange für die Embryogenese wie Kontrollen. Dies deutete auf eine Störung in der Embryonalentwicklung hin.

Genauere Untersuchungen zeigten Störungen bei Gelegen von Weibchen, denen eine Dosis von 1,4 µg Azadirachtin/g injiziert worden war. Bereits nach etwa sechs Tagen wurde bei den Gelegen behandelter Tiere eine intensive Schwarzfärbung in der Mitte der Eier sichtbar (Abb. 35). Bei normal ablaufender Embryogenese färben sich die Komplexaugen und auch das Tibia-Femur-Gelenk dunkel. Dies schimmert durch die Eihüllen leicht durch. Die dunklen Gebiete liegen an den Einden, während bei den Eiern der Versuchstiere die Schwarzfärbung intensiver ist und auch etwas früher in Erscheinung tritt. Besser untersuchen läßt sich das jeweilige Stadium lebender Embryonen durch kurzzeitiges Wässern in 10%igem Hypochlorit, ohne daß die Embryonen dadurch Schaden nehmen (Bentley et al., 1979). Hierbei wird die Eihülle vollkommen transparent und der Embryo sichtbar (Abb. 36).

Embryonen von Weibchen nach Azadirachtin-Behandlung zeigten schwere Entwicklungsschäden. Während die Kopfregion

meist normal ausgebildet war, fehlten entweder Segmente, oder das Abdomen war unsegmentiert, die Gliedmaßen asymmetrisch und nicht am Körper angelegt. Häufig traten auch Embryonen auf, bei denen der Kopf gut entwickelt war, der Rest des Körpers jedoch völlig fehlte (Abb. 37). Die grossen schwarzen Gebiete der Eihüllen waren auf Augen zurückzuführen, die zusammengewachsen waren und so eine abnorm große, pigmentierte Fläche bildeten. Embryonen waren, wenn sie normal entwickelt waren, kleiner als Kontrollen, die pigmentierten Körperteile (Augen) kamen in der Mitte der Eier zu liegen, da der Embryo nur etwa die Hälfte des Eivolumens ausfüllte (Abb. 38). Andere Embryonen aus den selben Eigelegen zeigten eine normale Entwicklung, benötigten im allgemeinen eine etwas längere Entwicklungsdauer als Kontrollen und schlüpften dann (nach etwa 20 Tagen) meist als normale Larven. Häufig konnte jedoch ein Verpilzen der Gelege beobachtet werden, das an anderer Stelle bereits beschrieben und auf eine fehlerhafte Eihülle zurückgeführt wurde (Ascher, 1980). Eine Störung der Eihüllenbildung ist möglicherweise auch die Ursache für die stärkere Transparenz der Eier behandelter Weibchen.

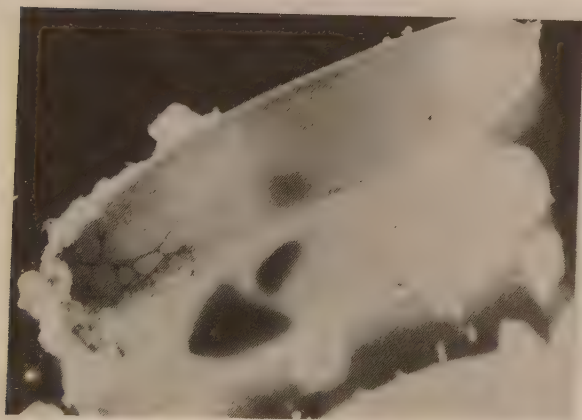
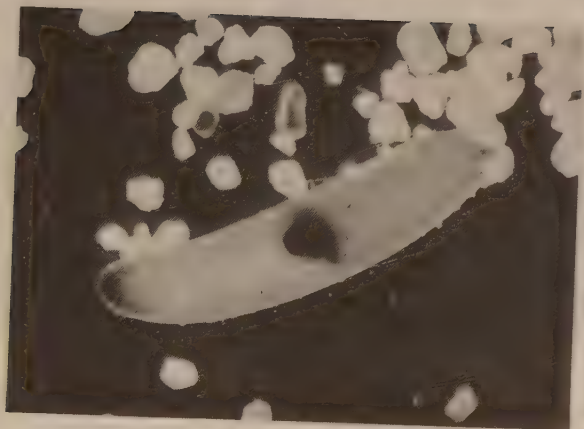


Abb. 35: 6 Tage alte Embryonen von Weibchen, die mit Azadirachtin ($1,4 \mu\text{g/g}$) injiziert worden waren. Auffällig ist die intensive Schwarzfärbung in der Mitte der Eier, die bei Kontrollen nicht auftritt.

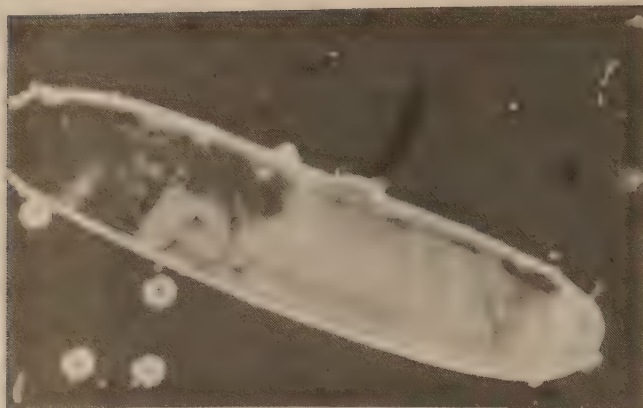


Abb. 36: Embryo eines Kontrollweibchens am 9. Tag nach der Eiablage. Transparenz der Eihüllen durch 10%ige Hypochloritlösung (5 min. wässern).



Abb. 37: Embryo eines mit Azadirachtin behandelten Weibchens 15 Tage nach der Eiablage. Der Thorax liegt in der Eimitte, das Abdomen ist unsegmentiert, die Lage der Extremitäten unnormale.



Abb. 38: Embryonen von mit Azadirachtin behandelten Weibchen mit schweren Mißbildungen. ★: everser Embryo nach gestörtem Rückenschluß. ☆: Aus der Eihülle herauspräparierter Embryo mit zusammengewachsenen Komplexaugen, Abdomen und Thorax sind praktisch nicht entwickelt.

4. Wirkung des Azadirachtins auf das neurosekretorische System

4.1. Histologie des Gehirns

In vorhergehenden Kapiteln war bereits die Möglichkeit angesprochen worden, daß Azadirachtin Einfluß auf endokrine Faktoren des Gehirns ausübt. Die Verteilung von neurosekretorischem Material des Retrocerebralkomplexes wurde daher in den drei letzten Larvalstadien und im Adultstadium histologisch untersucht und mit Gehirnen von Tieren verglichen, denen Azadirachtin injiziert worden war.

4.1.1. Neurosekretorische Aktivität der Kontrolltiere

Je nach Entwicklungszustand besaßen die Kontrolltiere unterschiedlich viel Neurosekret (NS) im Gehirn und in den Corpora cardiaca (CC). Im dritten und vierten Larvalstadium war NS nach Färbung mit Paraldehydfuchsin (PAF) bzw. Victorialblau nur in den CC zu finden. Auch bei Larven während der Häutung und jungen adulten Weibchen war kaum anfärbbares Material vorhanden. Bei Larven im fünften Stadium und auch bei Weibchen in der Vitellogenese phase war NS dagegen in allen retrocerebralen Bereichen des neurosekretorischen Systems nachweisbar. Ältere Weibchen besaßen vor allem im Sekretspeicher unterhalb der Pars intercerebralis (PI) und im speichernden Teil der CC große NS-Mengen. Es war auffallend, daß das Cytoplasma der medianen neurosekretorischen Zellen (MNSC) kaum Schwankungen in der Anfärbbarkeit zeigte, was auf die Möglichkeit eines sofortigen Weitertransports von NS in die Axone hindeutet.

4.1.2. Wirkung von Azadirachtin auf die Neurosekretion

Sowohl die Larven als auch die adulten Weibchen, denen Azadirachtin injiziert worden war, zeigten immer eine ungewöhnlich große Ansammlung von neurosekretorischen Granula in den Axonen und im CC. Das Cytoplasma der MNSC war nicht stärker gefärbt als in Kontrolltieren. Die Axone waren jedoch von der Pars bis zu den CC sehr stark angefärbt (Abb. 39). Die Nervi corporis cardiaci (NCC I) hatten nicht nur mehr NS, ihr Durchmesser vergrößerte sich auch bei manchen Larven, die eine stark verlängerte Stadiendauer zeigten, um ein Vielfaches (Abb. 40). Lakunenbildung, die bei mechanischer Blockierung des Transports nach Durchtrennung der NCC I hervorgerufen werden kann (Ulrich, 1976), wurde nie beobachtet. Gehirne von adulten Tieren, die länger als zwei Tage ohne Nahrung waren, besaßen ebenfalls beträchtliche Mengen an neurosekretorischem Material. Der Sekretstau erreichte jedoch nicht die Intensität und Ausdehnung wie bei den behandelten Tieren. Daß die Ansammlung von NS von behandelten Tieren (Abb. 41) nicht auf Fraßhemmung beruht, konnte anhand von Gehirnpräparaten injizierter Larven gezeigt werden, in denen eine große Menge NS gestaut war, obwohl die Tiere ein normales Fraßverhalten hatten. Auffallend war, daß andere neurosekretorische Zentren, wie etwa die Pars lateralis, weniger stark als in Kontrollen angefärbt wurden. Ebenso wie im Gehirn war im Suboesophagialganglion (SOG) der mit Azadirachtin injizierten Tiere die Anfärbbarkeit von neurosekretorischem Material erhöht;

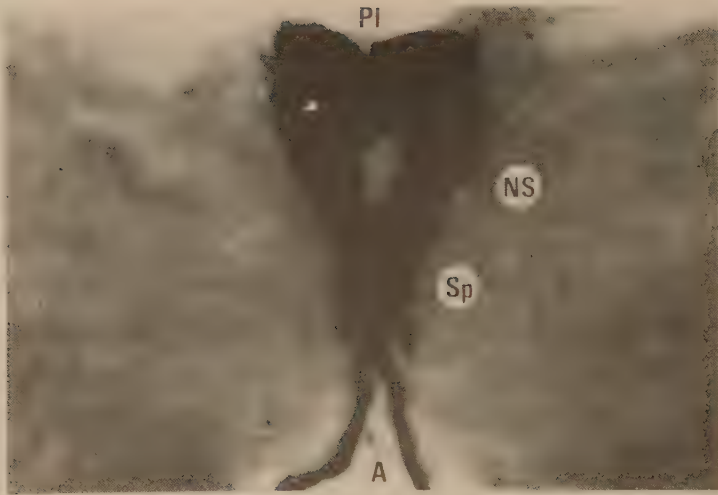


Abb. 39: Gehirn eines mit Azadirachtin injizierten Weibchens mit gestautem Neurosekret. PI: Pars intercerebralis, Ch: Chiasma, A: Axone der MNSC, die zum CC führen, NS: neurosekretorisches Material. (Victoriablaufärbung).

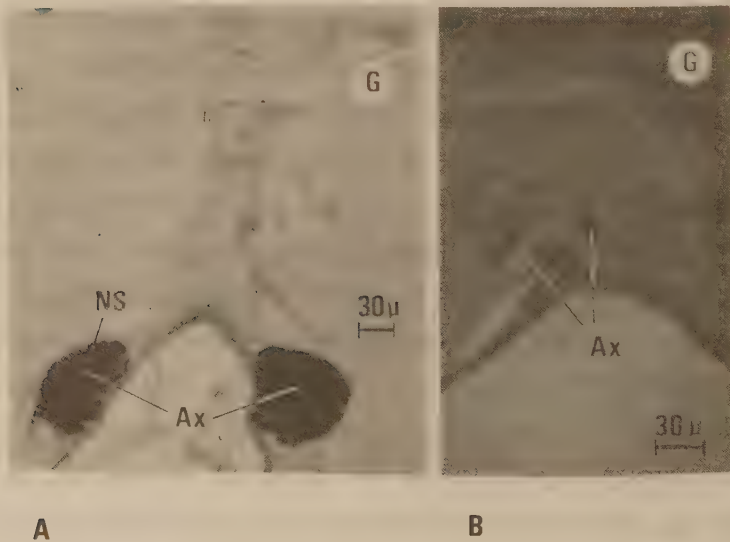


Abb. 40: Axone der MNSC einer mit Azadirachtin injizierten L5 (A) und einer unbehandelten L5 (B). G: Gehirn, NS: Neurosekret, Ax: Axone.



Abb. 41a: Pars intercerebralis und gestauchtes NS im Gehirn eines adulten Weibchens nach drei Tagen ohne Nahrung. MNSC: mediane neurosekretorische Zellen, PI: Pars intercerebralis, Ax: Axone der MNSC, NS: Neurosekret.

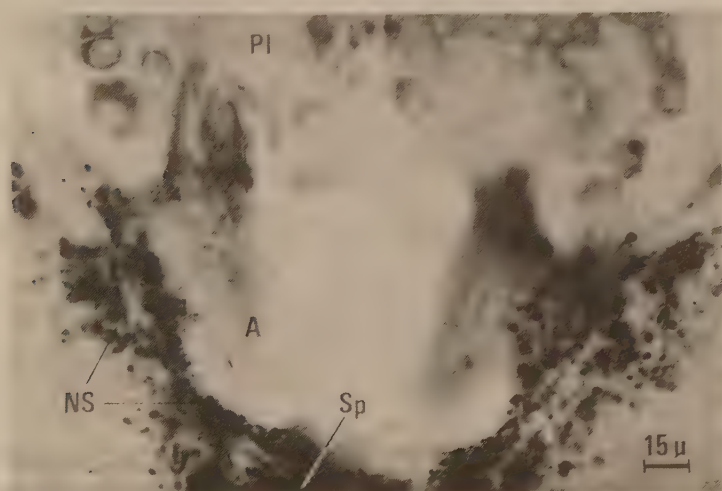


Abb. 41b: Pars intercerebralis und gestauchtes NS im Gehirn eines mit Azadirachtin behandelten Weibchens mit Eientwicklung und gleichzeitigem Körpergewichtsverlust. PI: Pars intercerebralis, NS: Neurosekret, Sp: Speicher, A: Axone der MNSC.

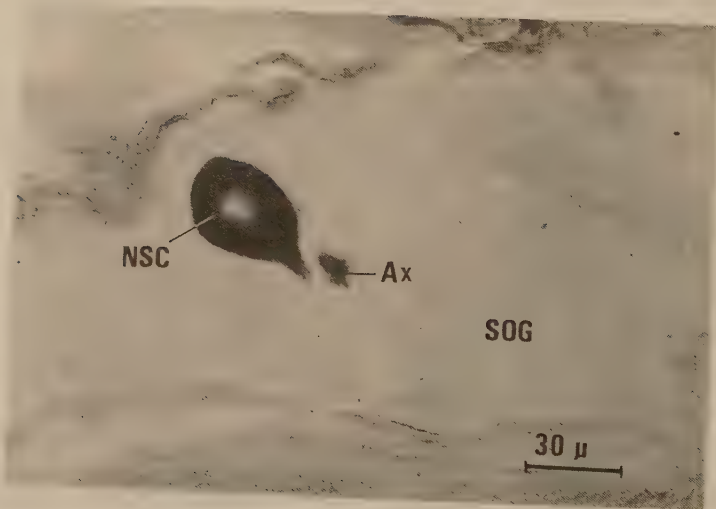
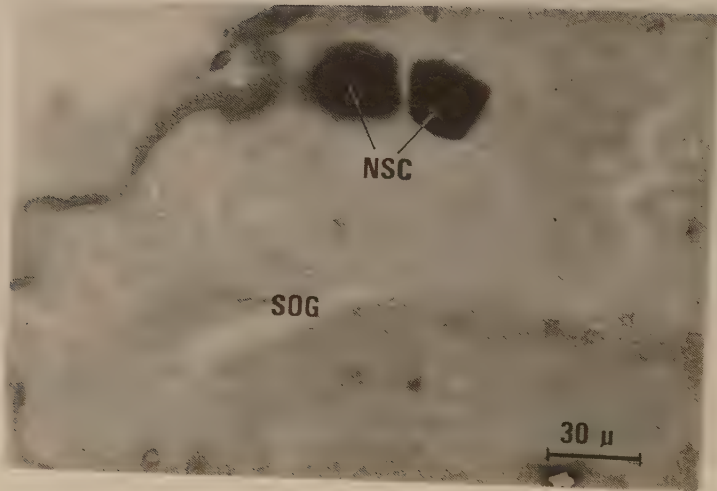


Abb. 42a,b: Serienschritte von neurosekretorischen Zellen im Subesophagealganglion einer L5 mit Häutungshemmung am 33. Tag des Larvalstadiums (nach Azadirachtininjektion am zweiten Tag nach der Larvenhäutung). SOG: Subesophagealganglion, NSC: neurosekretorische Zellen, Ax: zum Gehirn führendes Axon einer außerhalb der Schnittebene liegenden NSC.

eine Anzahl von Zellen war schwach gefärbt. Ein Unterschied zu Kontrolltieren zeigte sich jedoch darin, daß zwei distinkte, ventral gelegene Zellen des SOG nach Behandlung mit Azadirachtin intensiv gefärbt waren (Abb. 42). In Präparaten von Kontrolltieren konnten diese zwei neurosekretorischen Zellen durch ihre histologische Anfärbbarkeit ebenso lokalisiert werden, jedoch war sie hier nicht so stark ausgeprägt. Im SOG behandelter Tiere staute sich Neurosekret im Gegensatz zu den neurosekretorischen Zellen des Gehirns offensichtlich auch im Cytoplasma. Vom Ganglion zogen mit NS gefüllte Axone über die Konnektive zum Gehirn. Ein deutlicher Unterschied zu den Kontrollen zeigte sich in der Anfärbbarkeit. Offensichtlich handelt es sich um die von Rémy et al. (1980) beschriebenen neurosekretorischen Zellen, die immunohistochemisch mit Vasopressin- und Neurophysin-Antikörper anfärbbar sind.

Ein cytotoxischer Einfluß von Azadirachtin auf neuronales Gewebe ließ sich auf keinem der Präparate lichtmikroskopisch nachweisen. Die Strukturierung der Neuronen im Gehirn war von den Kontrollen nicht verschieden.

4.2. Histologie der Corpora allata

Für die Untersuchung der Wirkungsweise des Azadirachtins auf die Corpora allata (CA) und ihre zellulären Veränderungen ist eine genaue Kenntnis der Morphologie der CA unter den gegebenen Färbebedingungen notwendig.

Die CA sind paarige, kugelförmige Drüsen, die Juvenilhormon synthetisieren und freisetzen. Sie steuern damit viele

Prozesse der Ontogenese und der Eireifung. Durch nervöse Verbindungen der CA zum Gehirn (NCA I) und zum Suboesophagialganglion (NCA II) wird möglicherweise die Syntheseaktivität der Drüsenzellen reguliert (Tobe, 1980). Die Induktion und Aufrechterhaltung der Synthese geschieht jedoch humoral über die Hämolymphe durch einen Peptidfaktor (Allatotropes Hormon, ATH), aus der PI, das über die CC ausgeschüttet wird (Rembold et al., 1980; Tobe et al., 1977). In *Locusta* sind die CA bereits zu Beginn der Larvalzeit aktiv. Dies zeigt sich im Lichtmikroskop an dekondensierten Zellkernen. Der Zellverband der Drüsen ist morphologisch in den letzten Larvalstadien und in adulten Tieren homogen. Die peripheren Zellen sind in den Larvalstadien immer zu synthetisierenden Zellen ausdifferenziert, während die zentral gelegenen Zellen noch embryonal und inaktiv sein können. Die Drüsen sind bei Larven oft oval und enden im Bereich der NCA II in einer Spitze. Während des Körperwachstums nehmen die CA, bedingt durch eine intensive Zellteilung am Ende der Larvalstadien, stark an Volumen zu. Auch bei adulten Weibchen verdoppelt sich das Volumen der CA innerhalb des ersten Eireifungszyklus. Paarige Drüsen hatten in der Regel eine unterschiedliche Größe, die Form war meist kugelig. Die peripheren Zellen der CA sind etwas kleiner und werden mit Lichtgrün etwas intensiver angefärbt als die Zellen des zentralen Bereichs. Interzellulärräume waren bei den vorliegenden Präparaten nie vorhanden.

4.2.1. Wirkung des Azadirachtins auf die Corpora allata

Anders verhielten sich die histologischen CA-Präparate der Versuchstiere. Die Zellen der zentralen Region waren bei den larvalen CA degeneriert und hatten Interzellulärräume gebildet. Zellwände waren oft nicht mehr zu erkennen, die Zellkerne waren kondensiert und mit Lichtgrün intensiver angefärbt. Die Zellen der Peripherie dagegen waren im Aussehen normal (Abb. 43, 44). Anfärbbares Material war auf CA-Präparaten unbehandelter Tiere bisweilen zwischen den Zellen zu erkennen, jedoch wiesen die CA injizierter Tiere PAF-positives Material auf, das wie ein dichtes Netzwerk die Peripherie durchzog. Ein solcher Effekt war in den Kontrollpräparaten nie zu sehen. Inwieweit die Blaufärbung mit NS identisch ist oder bindegewebiges Material darstellt, ist nicht geklärt. Adulte Weibchen, denen Azadirachtin vor Beginn der Oogenese injiziert worden war und die daraufhin keine Eientwicklung mehr hatten, besaßen Drüsen, die sich nicht von CA der Kontrollen oder von Hungertieren unterschieden (Abb. 45, 46).

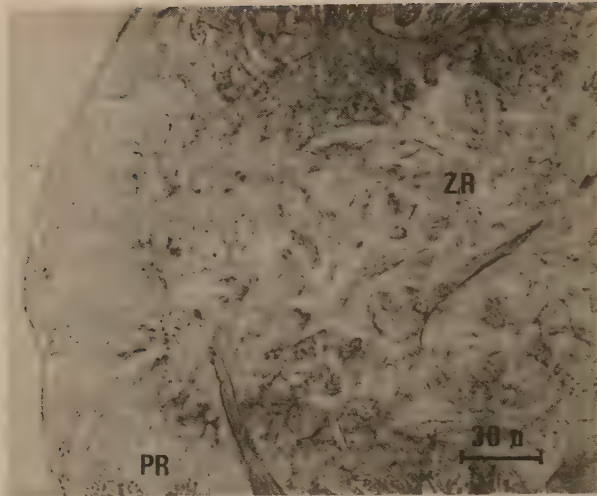


Abb. 43: Ausschnittvergrößerung eines CA, dessen zentrale Region (ZR) zerstörte Zellen zeigt. Periphere Zellen (PR) sind im Aussehen normal. PAF-Färbung der CA einer L5, der Azadirachtin ($2,5 \mu\text{g/g}$) injiziert worden war und deren Zellen synthesefähig sind (siehe Kap. 5.1.1.).

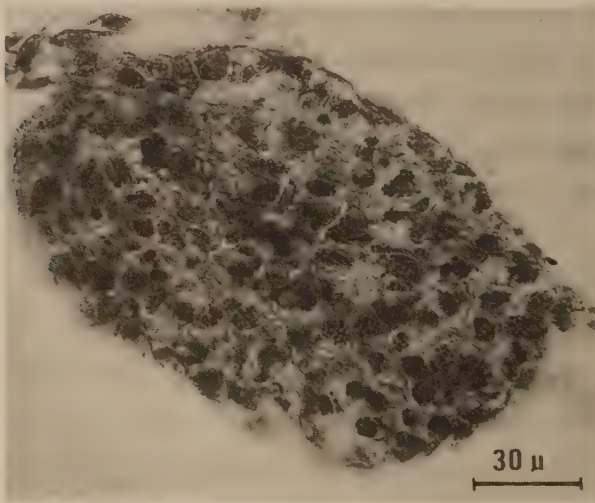


Abb. 44: CA einer Larve des vierten Stadiums nach Azadirachtininjektion. AZAN-Färbung. Ein Teil der Zellkerne ist teilweise zerstört.

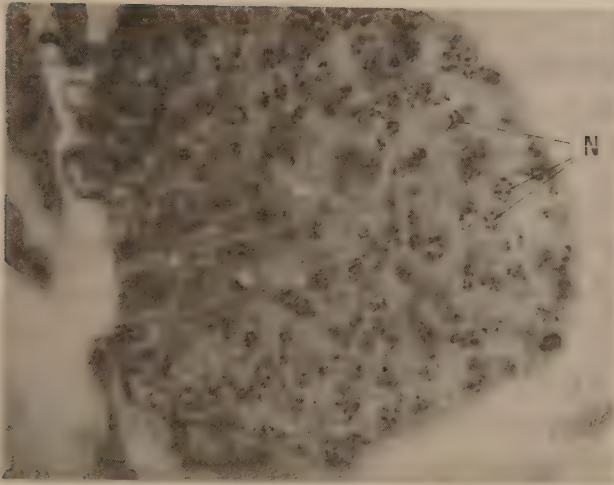


Abb. 45: CA eines adulten Weibchens mit Eireifungshemmung nach Injektion von Azadirachtin (3 µg/g). AZAN-Färbung.
N: Nuclei.

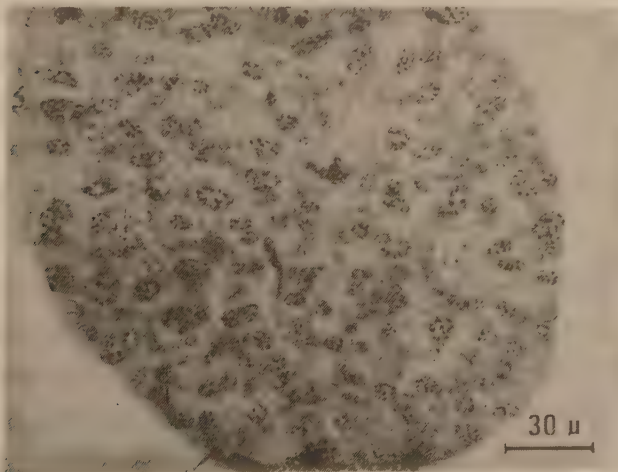


Abb. 46: CA eines adulten Kontrollweibchens nach dreitägigem Futterentzug. AZAN-Färbung.

5. Umsteuerung von Entwicklungsvorgängen durch Azadirachtin

Adultoide Ausprägungen in behandelten Larven nach der Larven-Larvenhäutung wiesen auf eine Störung hin, die nicht nur durch eine Hemmung der Ecdysteroidsynthese oder Veränderung des Ecdysteroidtiters ausgelöst sein konnte. Untersuchungen der Hämolympheproteine von Larven, die mit Azadirachtin injiziert worden waren, führten zu Ergebnissen, die auf eine Fehlsteuerung von Entwicklungsvorgängen hinweisen.

5.1. Änderungen im Entwicklungsablauf

Juvenilhormon steuert in *Locusta* verschiedene stadienspezifische Entwicklungsprozesse. So induziert und kontrolliert JH die Eireifung in adulten Weibchen, während bei den Larven das gleiche Hormon die Häutung modifiziert. JH-Applikation oder Implantation adulter weiblicher CA führt bei Larven des letzten Stadiums zu einer zusätzlichen Larven-Larvenhäutung (Inyeon und Tobe, 1981), in allatektomierten Weibchen jedoch zu Vitellogenese und Eireifung.

5.1.1. Vitellogeninsynthese im Larvalstadium

Injektion von Azadirachtin führt vereinzelt zu Larven, die nach extremer Verlängerung der Stadiendauer sich nicht zu häuten vermochten. Solche Larven unterschieden sich weder im Verhalten noch in ihren morphologischen Merkmalen von den Kontrolltieren. Über Wochen wurde jedoch ein konstantes Körpergewicht von 1,3 g (fünftes Stadium) bzw. 0,55 g (viertes Stadium) gemessen, ein Gewicht, bei dem sich un-

behandelte Larven zu häuten beginnen. Die Konzentration der Hämolympheproteine war bei diesen Versuchstieren höher (50 µg/g bei L5) als bei den Kontrollen.

Die elektrophoretische Auftrennung der Hämolympheproteine aus mit Azadirachtin injizierten Larven zeigte, daß Vitellogenin den Hauptbestandteil der löslichen Proteine ausmachte (Abb. 47a). Vitellogenin war in Konzentrationen vorhanden, die in normalen unbehandelten Weibchen nie gefunden werden, sondern nur nach Ovariektomie erreicht werden können (Mwangi und Goldsworthy, 1980). Der hohe Vitellogentiter der im vierten und fünften Larvalstadium mit Azadirachtin injizierten Tiere war über mehrere Tage hinweg gleichbleibend hoch, ohne daß erkennbar Vitellogenin in das Ovar aufgenommen wurde, das klein und larval geblieben war, obgleich Einschlüsse von gelbem Material zu erkennen waren. Durch Elektrophorese des homogenisierten Ovars konnten die charakteristischen Banden von Vitellin nicht nachgewiesen werden, die sich von Vitellogenin durch ein kleineres Molekulargewicht der zwei leichtesten Untereinheiten unterscheiden. Durch Inkubation mit Anti-Vitellogenin-Antiserum und anschließender elektrophoretischer Auftrennung des mit Protein A - Agarose präzipitierten Antigen-Antikörper-Komplexes wurde eindeutig gezeigt, daß das neu synthetisierte Protein mit Vitellogenin identisch ist.

Die Untersuchung einer Larve des vierten Stadiums, der im Abstand von drei Tagen 20 µl Hämolymphe entnommen worden war, ließ erkennen, daß erst am 55. Tag nach der letzten Häutung Vitellogenin synthetisiert worden war. Die Vitello-

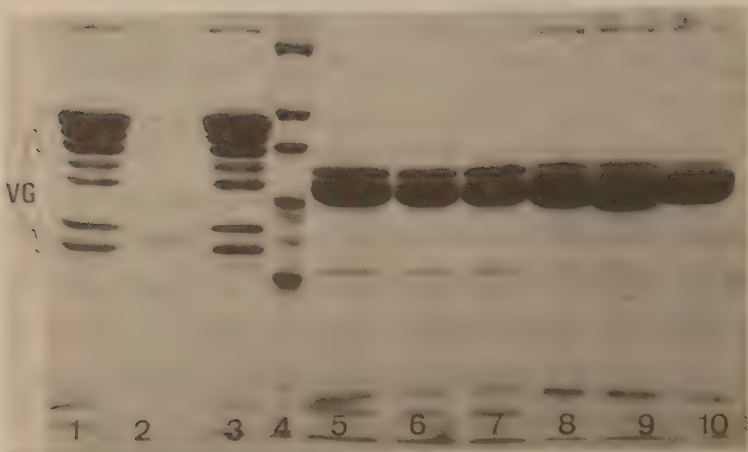


Abb. 47a: SDS-PAGE (10 %) von Hämolympheproteinen aus Larven des fünften Stadiums nach Azadirachtin-Injektion und aus unbehandelten L5. Tag 44 (1); Tag 44 nach Immunopräzipitation der Proteine mit Anti-Vitellogenin-Antiserum (2); Tag 48 (3); Standards (4); 5-7: Versuchstiere Tag 6 (5), 7 (6), 8 (7) (Hämolymphe von 10 Tieren wurden zusammengefaßt; 8-10: Kontrolltiere, Tag 8 (8), 9 (9), 10 (10) (Hämolymphe von 60 Tieren wurde zusammengefaßt. VG: Vitellogenin.

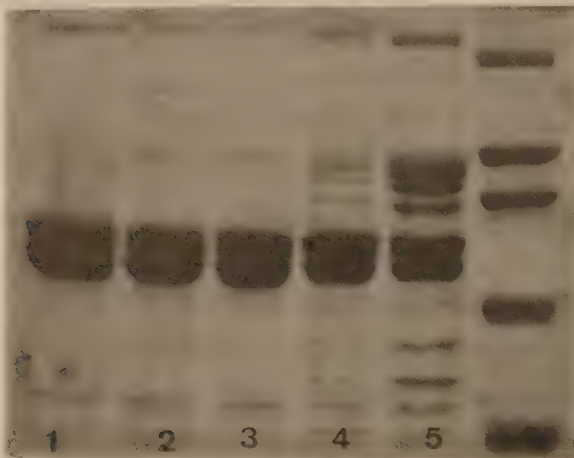


Abb. 47b: SDS-PAGE von Hämolympheproteinen einer mit Azadirachtin injizierten L4, die zu verschiedenen Zeiten entnommen wurden. Tag 52 (1), 55 (2), 57 (3), 61 (4), 64 (5), Standards (6). VG: Vitellogenin.

genin synthetisiert worden war. Die Vitellogenin-Konzentration stieg kontinuierlich an und erreichte am 64. Tag nach der Häutung den höchsten Wert (Abb. 47b).

5.1.2. Ovardifferenzierung im Larvalstadium

Die Ovarien von Locusta migratoria beginnen sich normalerweise in den ersten Tagen des Adultstadiums zu entwickeln (Chen et al., 1976). In den Larvalstadien bleiben die Oozyten und Follikelzellen undifferenziert (Abb. 48).

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, daß mit Azadirachtin behandelte Larven des vierten und fünften Larvalstadiums in der Lage sind, Vitellogenin zu synthetisieren, sollte untersucht werden, ob in diesen Larven auch andere stadienfremde Prozesse initiiert wurden. Mit histologischen Methoden wurde das Ovar und der Fettkörper einer Larve des vierten Stadiums untersucht, bei der nach Azadirachtinbehandlung Vitellogenin in der Hämolymphe nachgewiesen worden war.

Das Ovar war nicht größer als Ovarien unbehandelter Larven des vierten Stadiums, eine Oogenese war nicht erkennbar. Doch waren auch hier nach Azadirachtinbehandlung im Ovar gelbliche Einschlüsse erkennbar. Dies konnte anhand histologischer Präparate auf schollenförmiges Material im Oocyten cytoplasma zurückgeführt werden, das in die Oozyten eingebaut worden war (Abb. 49). Die Follikelzellen waren zu einem zusammenhängenden Gewebe zylinderförmiger Zellen ausdifferenziert und im Vergleich zu Follikelzellen larvaler

Kontrolltiere vergrößert. Die Follikelzellen sind morphologisch mit Follikelepithel vergleichbar, wie sie in adulten Ovarien in der Prävitellogenese und zu Beginn der Vitellogenese vorkommen (Abb. 50, 51). Jedoch war die Differenzierung des Ovars im wesentlichen auf zwei sich unregelmäßig entwickelnde Oozyten beschränkt, während andere Oozyten larval blieben. Auffällig war, daß das Follikel-epithel der jeweiligen Oozyten uneinheitlich ausdifferenziert war, während Follikelzellen unbehandelter adulter Weibchen homogene Epithelien bilden. Die Abb. 52-54 veranschaulichen die unterschiedliche Morphologie von Follikelzellen, die dem Epithel desselben Follikels zugehören. Offensichtlich beruhen diese morphologischen Unterschiede auf unterschiedlichen physiologischen Aufgaben, wie dem Einbau von Substanzen, die im Fettkörper synthetisiert wurden, und von Synthesen in den Follikelzellen selbst. Auch im Fettkörper sind lichtmikroskopisch tropfenförmige Einschlüsse im Cytoplasma der Zellen zu erkennen, die offensichtlich mit synthetisiertem Material identisch sind, das in der Hämolymphe elektrophoretisch nachgewiesen werden kann (vgl. S. 85).

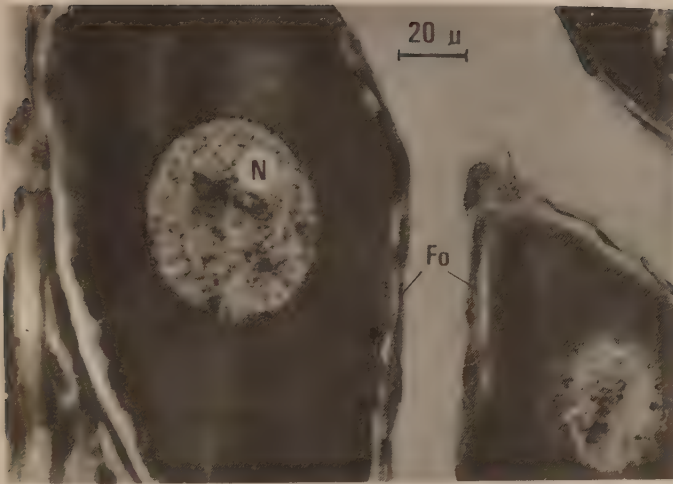


Abb. 48: Oozyten einer unbehandelten Larve des vierten Stadiums. Fo: undifferenziertes Follikel­epithel, N: Nucleus. AZAN-Färbung.

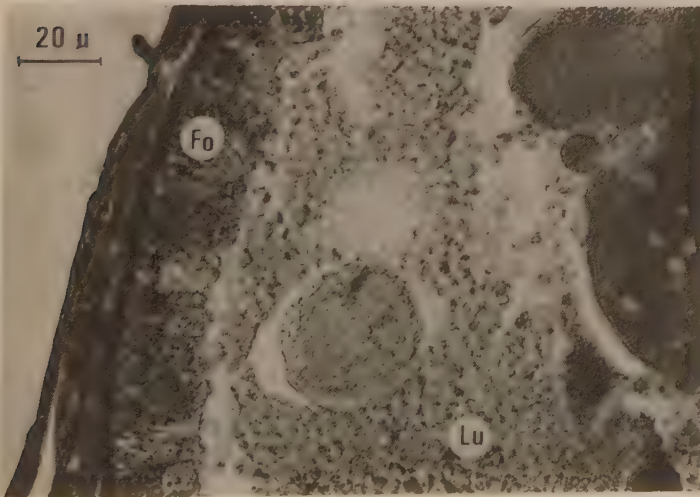


Abb. 49: Ausschnittsvergrößerung einer Oozyte mit Follikelzellen (gleicher Maßstab wie Abb. 43) von einer Larve des vierten Stadiums, die am zweiten Tag nach der Häutung mit Azadirachtin injiziert worden war. Fo: Follikelzellen, Lu: Oozytenlumen mit eingebautem Material, AZAN-Färbung.

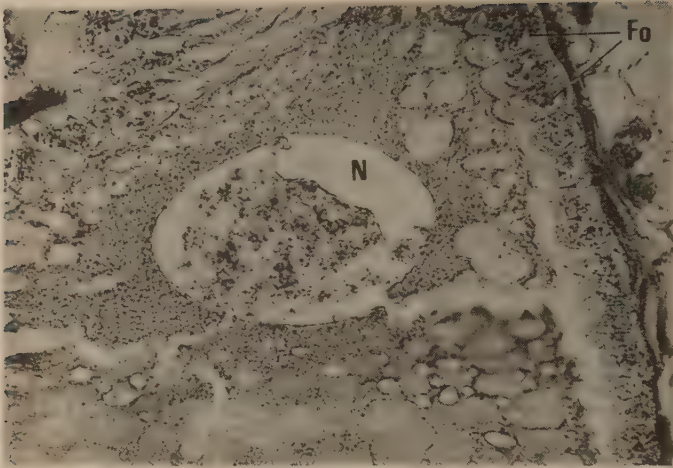


Abb. 50: Ausschnittvergrößerung einer Oozyte zu Beginn der Vitellogenese (2,5 mm LTO) von einem unbehandelten adulten Weibchen. Deutlich ist eingebautes Eidottermaterial zu erkennen. Fo: Follikelepithel, N: Nucleus. AZAN-Färbung.

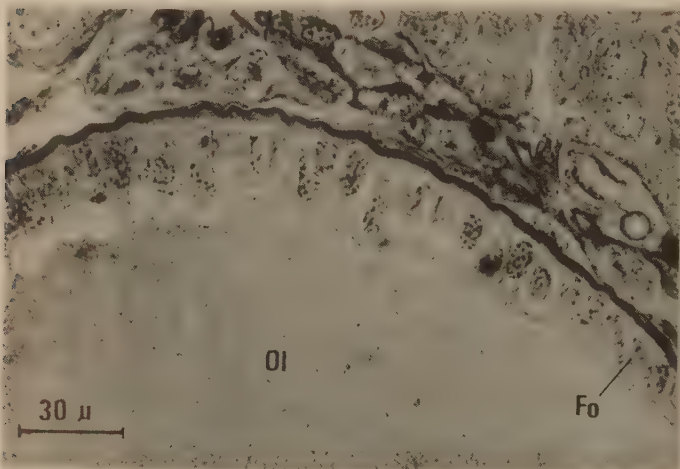


Abb. 51: Ausdifferenziertes Follikelepithel einer mit Azadirachtin injizierten L4 nach 64 Tagen ohne Häutung. Der Differenzierungsgrad der Follikelzellen ist mit dem in Abb. 50 vergleichbar. Fo: Follikelepithel, Ol: Oozytenlumen, AZAN-Färbung

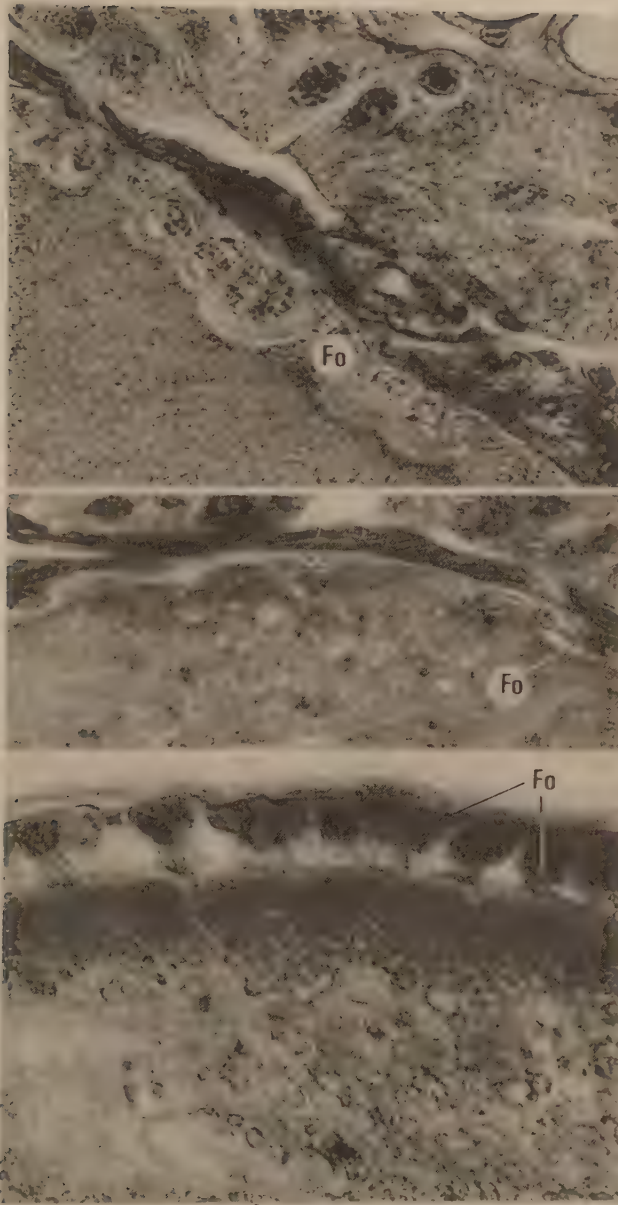


Abb. 52-54: Unterschiedlicher Ausdifferenzierungsgrad von Zellen desselben Follikel­epithels einer mit Azadirachtin injizierten L4. Fo: Follikelzellen; weitere Erklärungen siehe Text.

IV. DISKUSSION

Azadirachtin führt bei Locusta migratoria zu schweren Störungen im Ablauf der Häutung und der Eireifung. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, Ursachen und Wirkungsmechanismen der durch Injektion von Azadirachtin auslösbaeren morphologischen und physiologischen Phänomene zu untersuchen.

1. Dosis-Wirkungsbeziehung

Mit seiner bei geringen Dosen hohen Wirksamkeit (vgl. S. 22) und seinen entwicklungshemmenden Eigenschaften ist Azadirachtin ein hoch wirksamer Wachstumsregler (Insect growth regulator, IGR). Bereits bei 0,6 µg/g treten während der Larvalentwicklung Häutungsschwierigkeiten und Mortalität auf. Eine geringe Dosiserhöhung (2 µg/g) löst bereits bei allen Tieren Stadienverlängerung und letale Häutungsstörungen aus. Der steile Anstieg der Wirkungsrate bei steigender Dosis läßt ein spezifisches Eingreifen des Azadirachtins vermuten, jedoch können hieraus keine Aussagen über mögliche Wirkungsmechanismen gemacht werden, da die morphogenetischen Effekte komplexer Natur sind und über selbstregulierende Systeme und Feedback-Mechanismen gesteuert werden. Neben dieser die Häutung hemmenden Störung wirkt sich ein zusätzlicher Effekt des Azadirachtins auf den Metabolismus von L. migratoria aus, erkennbar an der hohen Mortalitätsrate bei beginnender Sättigung der Wirkungskurve (Abb. 6, 24). Hierauf wird im zweiten und vierten Abschnitt der Diskussion näher eingegangen.

Ein Vergleich mit gebräuchlichen Insektiziden (Tab. 3) veranschaulicht die hohe Selektivität des Azadirachtins. Ein direkter Vergleich der verschiedenen Substanzen wird allerdings dadurch erschwert, daß die Wirkung in unterschiedli-

Tab. 3: Letale Dosis (LD_{50}) verschiedener Insektizide (verändert nach Brooks, 1976) im Vergleich mit Azadirachtin.

*: loc. cit. Gaines (1969), +: Hollingworth (1967).

Insektizid	$\mu\text{g/g}$	Applikationsform	Insektenart
Carbaryl	900	topikal	M. domestica
Acethion	375	Injektion	P. americana
Lindan	3 - 7	Injektion	
Malathion	8,4	Injektion	
Pyrethrin	6,0	Injektion	
Rotenon	5 - 8	Injektion	
DDT	5 - 18	Injektion	
Aldrin*	2,3	topikal	M. domestica
<u>Azadirachtin</u>	<u>1,5 (1,3^a)</u>	<u>Injektion</u>	L. migratoria
Dieldrin	1,1	Injektion	P. americana
Parathion	0,95	Injektion	P. americana
Methopren (ZR 515) ⁺	0,02	topikal	T. molitor
	(0,004 ^a)	topikal ($\mu\text{g/Puppe}$)	T. molitor
	(1,1 ^a)		G. mellonella

^a Häutungshemmende Dosis (ED_{50})

chen Insektenarten variieren kann. Ferner ist der Wirkungsgrad einer Substanz von ihrer Applikationsform abhängig. In der Regel wird ihre schnelle und homogene Ausbreitung im Organismus durch Injektion am leichtesten erzielt. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb Azadirachtin grundsätzlich injiziert.

2. Der Effekt der Fraßhemmung

Die Mortalität ist bereits bei niedrigen Azadirachtindosen sehr hoch (vgl. S.24). Sie liegt nur wenig unter dem Prozentsatz von Tieren, die spezifische Entwicklungsstörungen aufweisen. Hier liegen zwei getrennte Effekte vor. Ein dosisabhängiger, starker Gewichtsverlust ist die Ursache für eine hohe Mortalität nach Azadirachtin-Injektion (Abb. 7). Die Gewichtsabnahme ist die Folge einer Fraßhemmung, wie ein Vergleich der täglich ausgeschiedenen Faecesmenge mit der von unbehandelten und ohne Futter gehaltenen Tiere zeigt. Bereits Butterworth und Morgan (1971) haben die Fraßhemmung von Neem-Extrakten bei S. gregaria nach oraler Gabe beschrieben. Nach eigenen Beobachtungen beruht sie auf einer fraßabschreckenden Wirkung des Azadirachtins. Dabei war die Substanz in geringsten Mengen ($0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) auf die Blattfläche appliziert worden.

Neben dieser offensichtlich auf Kontakterkennung beruhenden Abschreckung löst Azadirachtin auch nach Injektion Fraßhemmung aus. Hierbei spielt die Perzeption durch Mundwerkzeuge, vor allem der Chemorezeptoren der Maxillarpalpi, keine Rolle mehr. Da

nach Injektion hoher Dosen Azadirachtin Nahrung generell verweigert wird, kann davon ausgegangen werden, daß der sensorische Input der Rezeptoren nicht mehr zentral verarbeitet werden kann. Hunger, einschließlich gerichtetes Appetenzverhalten, welches die periphere Sensivität der Rezeptoren moduliert, wurde bei den Versuchstieren nicht beobachtet. Vermutlich ist die Fraßhemmung auf eine Störung im Zentralnervensystem zurückzuführen.

3. Wirkung auf den Ablauf der Häutung

Da sich unbehandelte Larven trotz Futterentzug bis zu vier Tagen normal häuten können, liegt den beobachteten Häutungsstörungen nach Azadirachtin-Injektion ein anderer Mechanismus zugrunde. Die Larven nehmen durchaus bis zu dem Gewicht zu, bei dem sich Kontrollen häuten. Dann aber bleiben sie trotz ihres hohen Körpergewichtes über Wochen hinweg im selben Larvalstadium. Histologische Untersuchungen ergaben, daß Azadirachtin die Bildung einer neuen Kutikula vollständig hemmen kann. Die Epidermiszellen beginnen zwar in manchen Körperregionen (Abdomen) mit der Lyse der Endokutikula (Abb. 14), die Apolyse bleibt auf diesem Stadium jedoch stehen. Larven mit solchen morphologischen Störungen erreichen zu keinem Zeitpunkt eine Ecdysteroidkonzentration in der Hämolymphe, die ausreicht, um Kutikulogenese zu induzieren (vgl. S. 43). Die gemessenen Maximalwerte von etwa 3 ng Ecdysteroid/ μ l (Abb. 19) liegen weit unter den Konzentrationen von Kontrolltieren (12 ng/ μ l). Sie reichen aber aus, um lokal begrenzt den Beginn der Apolyse zu induzieren.

Die vollständige Hemmung von Häutungsprozessen durch Reduktion des Ecdysteroid-Titers findet man nur bei einem geringen Prozentsatz der Versuchstiere. Die Mehrzahl der Larven bildet auch nach Injektion von Azadirachtin eine neue Kutikula nach Stadienverlängerung. Die Ecdysteroidkonzentration erreicht ähnliche Werte wie die von unbehandelten Larven des vierten und fünften Stadiums (12 ng/ μ l). Störungen in der Kutikulogenese, wie sie bei allen Larven mit Häutungsstörungen auftreten, sind also nicht die Folge einer reduzierten Ecdysteroidsynthese. Der Titerverlauf von Ecdyson und seinen Metaboliten zeigt vielmehr eine andere Kinetik als in den unbehandelten Kontrolltieren (Abb. 18). So waren innerhalb des fünften Larvalstadiums Ecdysteroide nach Azadirachtin-Injektion über einen längeren Zeitraum hinweg (8 Tage) als bei Kontrolltieren (3 Tage) nachweisbar, bedingt durch den wesentlich langsameren Anstieg der Ecdysteroidkonzentration. Hemmung und unnormaler Verlauf von Häutungsprozessen nach einmaliger Azadirachtin-Injektion ist in der vielfältigen Funktion der Ecdysteroide bei der Häutung begründet. Sie müssen zeitlich genau abgestimmt in endokrine Folgeprozesse eingreifen. 20-Hydroxyecdyson kontrolliert z.B. bei der Sklerotisierung der Kutikula einen Schritt bei der Biosynthese des n-Acetyl-Dopamins (Sekeris und Karlson, 1966). Ein Peptidhormon aus dem neurosekretorischen System (Eclosionshormon, EH) kann nur dann Bursiconausschüttung und Häutungsverhalten induzieren, wenn zuvor die Ecdysteroide unter eine kritische Minimalkonzentration gesunken sind (Truman et al., 1981). Offensichtlich sind endokrine Folgeprozesse nur möglich, wenn die zeitliche

Modulation des Ecdysteroid-Titers streng eingehalten wird. Es ist offensichtlich, daß der gestörte Titerverlauf nach Injektion von Azadirachtin (vgl. Abb. 18) Ursache der Häutungsstörungen ist. Die Ecdysonsynthese der PTG, möglicherweise bereits ihre Induktion, scheint außer Kontrolle zu geraten. Dies wird vor allem erkennbar am Ecdysteroid-Titer einer Larve mit gehemmter Kutikulogenese (Abb. 19). Der unnormale Titerverlauf läßt unkontrollierte, möglicherweise autonome Syntheseaktivitäten der PTG vermuten.

Ein Vergleich der quantitativen Zusammensetzung der Ecdysteroid-Metabolite von Kontrolltieren mit Larven, denen Azadirachtin injiziert wurde, zeigt einen wesentlich geringeren prozentualen Anteil an biologisch aktiven Ecdysteroiden in den Versuchstieren. Obgleich die physiologische Relevanz der hoch polaren Konjugate unklar bleibt, läßt der unterschiedliche Titerverlauf, vor allem nach enzymatischer Hydrolyse, vermuten, daß Azadirachtin möglicherweise auch den Ecdysteroid-Metabolismus direkt beeinflußt.

Die häutungshemmende Wirkung des Azadirachtins konnte durch tägliche Injektionen von 20-Hydroxyecdysen ($5 \mu\text{g}/\text{Tag}$) nicht aufgehoben werden, wenn die Azadirachtindosis höher als $2,5 \mu\text{g}/\text{g}$ war. Versuche mit niedrigeren Dosierungen von Azadirachtin und anschließender Injektion von 20-Hydroxyecdysen wurden nicht durchgeführt.

Ein Eingreifen des Azadirachtins in andere, von Ecdyson nicht kontrollierte Prozesse wird bei der Larven-Larvenhäutung erkennbar. Nach Injektion zu Beginn des dritten und vierten Larvalstadiums wird eine neue Kutikula mit adulten Merkmalen gebildet (Abb. 9, 10), was auf eine Störung von JH-gesteuerten Prozessen schließen läßt. An- oder Abwesenheit von JH steuert zum Zeitpunkt eines Ecdysteroidpeaks die morphologische Ausprägung (Larve/Adult) des folgenden Stadiums (Wigglesworth, 1964). Substanzen wie das Precocen (Bowers et al., 1976), die ebenfalls adulte Merkmale in Insekten hervorrufen, wirken selektiv auf die CA (chemische Allatektomie), deren Gewebe zerstört wird (Bowers et al., 1976, Bowers, 1981, Pener et al., 1978). Eine solche cytotoxische Wirkung hat das Azadirachtin nicht, wie histologische Untersuchungen belegen (vgl. S. 80). Die CA behalten ihre Fähigkeit, physiologische Vorgänge zu kontrollieren. Dies soll in einem späteren Abschnitt diskutiert werden (Abschnitt 6).

4. Wirkung auf die Eireifung

Azadirachtin hemmt im adulten Weibchen JH-abhängige Eireifungsprozesse und als Folge davon bleiben die Ovarien unentwickelt. Ursache für das fehlende Wachstum der Oozyten ist die Hemmung der Vitellogenese (vgl. S. 60), wie durch SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen wurde. Die Eireifungshemmung nach Azadirachtin-Behandlung kann aber mehrere Ursachen haben, von der indirekten Einwirkung über die Änderung des Fraßverhaltens bis zur direkten Hemmung in der Ausschüttung von neurosekretorischen Induktionsfaktoren.

Die dosisabhängige Reduktion der Nahrungsaufnahme von Weibchen nach einer Injektion von Azadirachtin führt zur Eireifungshemmung, wie auch in unbehandelten Weibchen nach Futterentzug die Eireifung blockiert wird (vgl. S. 54). Bei hungernden Tieren beruht dies nicht primär auf einer fehlenden Nährstoffzufuhr, sondern auf der endokrin gesteuerten Abschaltung der CA (Mc Caffery, 1976, Tobe und Chapman, 1979), unter deren Kontrolle die Vitellogenese steht (Engelmann, 1974). Die Inaktivierung der CA wird nervös gesteuert (Tobe, 1980). Hungertiere behalten ihre Fraßappetenz, während mit Azadirachtin behandelte Weibchen die angebotene Nahrung nicht beachten, also keinen "Hunger verspüren". Es ist daher möglich, daß die Hemmung der Vitellogenese noch andere Ursachen als bei den hungernden Kontrolltieren hat. Hinweise auf eine direkte Einwirkung des Azadirachtins auf das endokrine System gibt das anders geartete Bild der Eireifungshemmung. So ist die Resorption von Oozyten, anders als bei hungernden Weibchen, nicht sehr stark ausgeprägt. Eine Mobilisierung von bereits in Oozyten eingelagerten Nährstoffen tritt nicht ein. Eine bereits begonnene Eireifung scheint dadurch angehalten zu werden, daß induzierende Faktoren nicht mehr zur Verfügung stehen. Histologisch sind im Fettkörper und im Ovar keine Schädigungen als Ursache für die Hemmung der Oogenese feststellbar. Oozyten können mitunter bei drastischem Körpergewichtsverlust bis zur legereifen Länge von 6,2 mm wachsen, allerdings ohne daß sie abgelegt werden. Der Einfluß auf das Reproduktionsvermögen von E. varivestis ohne gleichzeitige Fraßhemmung ist ein

weiterer Hinweis darauf, daß Azadirachtin nicht nur über ein verändertes Fraßverhalten in die Eireifung eingreift (Steets, 1976). Azadirachtin könnte auf drei Arten in die Eireifung hemmend einwirken:

1. Durch verringerte Nährstoffzufuhr werden keine Grundstoffe für die Eiproduktion zur Verfügung gestellt.
2. Die JH-Synthese wird, wie bei hungernden Kontrolltieren, durch Regelkreise inhibiert.
3. Azadirachtin hemmt direkt die Ausschüttung oder Synthese von neuroendokrinen Faktoren, welche für die Synthese von die Oogenese kontrollierenden Hormonen verantwortlich sind

Injektionen von Azadirachtin zu einem Zeitpunkt, an dem die Vitellogenese bereits begonnen hat (3,5 - 4 mm LTO), können ebenso wie Allatektomie (Joly et al., 1978) die Eireifung nicht mehr hemmen. Jedoch wird durch Azadirachtin der massive Einbau von Ecdysteroiden aus den Follikelzellen in die Oozyten am Ende der Oogenese gehemmt (Abb. 32). Die stark erniedrigte Konzentration in reifen Oozyten der injizierten Weibchen kann mit verminderter oder gehemmter Synthese in den Follikelzellen gleichgesetzt werden, da die Ecdysteroidselektiv in die Oozyten eingebaut werden, erst in der Embryogenese biologisch aktiv werden und dort die Hüllenbildung steuern (Hoffmann et al., 1980). Offensichtlich beruhen die Embryogenesestörungen in Eiern von Weibchen, denen niedrige Azadirachtindosen (1,4 µg/g) injiziert worden waren, auf zu geringen Ecdysteroidkonzentrationen, so daß die Morphogenese nicht

mehr koordiniert gesteuert werden kann (Abb. 38), und nicht auf zu geringe Mengen eingelagertes Vitellin. Eine Reduzierung der Nährstoffe führt zu kleineren, jedoch normalen Larven.

5. Wirkung auf die Neurosekretion

Azadirachtin greift in allen Stadien in die endokrine Steuerung von Entwicklungsprozessen hemmend ein, indem die Konzentration und der Titerverlauf von Hormonen beeinflusst wird. Jedoch konnten durch die bis jetzt diskutierten Experimente nicht geklärt werden, auf welchen Mechanismen die Interaktion beruht.

Durch Injektionen zu Beginn der jeweiligen Stadien konnten die durch Azadirachtin hervorgerufenen Effekte dosisbezogen quantifiziert und beschrieben werden. Injektionen in den verschiedenen Phasen der Entwicklung innerhalb eines Stadiums lassen jedoch Aussagen darüber zu, welche Prozesse ab einem bestimmten Injektionszeitpunkt ungehindert ablaufen und welche Prozesse gehemmt werden. So ruft Azadirachtin (3 - 5 µg/g) bei allen Larven des vierten Stadiums Häutungshemmung und Stadienverlängerung hervor, wenn die Injektion in den ersten beiden Tagen erfolgte. Am dritten Tag nach der Häutung injiziert, hemmt dieselbe Dosis die Larven-Larvenhäutung nicht mehr (Abb. 20). Dies ist überraschend, da der Titer des Häutungsinduzierenden 20-Hydroxyecdysons erst am vierten Tag des Stadiums ansteigt. Auffällig ist der kurze Zeitraum von 24 Stdn., in dem Azadirachtin seine Wirkung verliert. Zum selben

Ergebnis führen Untersuchungen im fünften Larvalstadium, in dem sehr hohe Dosen keine Störungen der Häutungsprozesse mehr hervorrufen, wenn sie am vierten Tag des Stadiums oder später injiziert werden.

Offensichtlich verhindert die Azadirachtin-Injektion in den ersten beiden Tagen des Stadiums Synthese oder Ausschüttung eines induzierenden Faktors, der am dritten Tag des vierten Stadiums bereits freigesetzt und biologisch aktiv ist. Der Faktor (Prothoracotropes Hormon, PTTH), der die Ecdyson synthetisierende Prothoraxdrüse stimuliert, wird in den neurosekretorischen Zellen der Pars intercerebralis synthetisiert und axonal zum Neurohämalorgan (CC) transportiert (Girardie und De Reggi, 1978, Gersch und Bräuer, 1974).

Larven mit gehemmter Ausschüttung von PTTH und anderen induzierenden Faktoren vermögen sich dann zu häuten, wenn ihnen die fehlenden Faktoren über homogenisierte Gehirne von Larven am vierten Tag in die Hämolymphe injiziert werden (vgl. S 48). Die geringe Zahl der Larven, die sich nach der Injektion von Gehirnhomogenat häuten konnten, beruht möglicherweise auf einer ungenügenden Freisetzung von Faktoren aus Vesikeln durch Ultraschall. Auch die Menge Gehirnhomogenat wurde nicht bestimmt, die nötig ist, um Häutungsprozesse zu induzieren. Da die verwendete Azadirachtindosis mit 4,5 µg/g weit über der wirksamen Dosis liegt, zeigt bereits die Häutung weniger Larven, daß im Gehirnhomogenat behandelter Larven häutungsinduzierende Faktoren frei vorliegen, deren Ausschüttung vorher gehemmt war.

Die Interaktion von Azadirachtin mit Kontrollfunktionen des Gehirns wurde durch Transplantationsversuche nachgewiesen, kann aber ebenso durch morphologische Veränderungen im Retro-cerebralkomplex histologisch belegt werden. Bei der Kontrolle von hormonell gesteuerten Entwicklungsvorgängen spielt das Gehirn eine übergeordnete Rolle, wie schon früh durch Exstirpations- und Reimplantationsversuche gezeigt werden konnte. Bereits Kopeć (1922) vermutete einen humoralen Einfluß des Gehirns auf das endokrine System. Insekten besitzen wie Vertebraten ein hiarchisch angelegtes Hormonsystem, das durch Faktoren aus dem Gehirn, hauptsächlich Peptide, die peripheren Drüsen steuert und aktiviert. Eine Vielzahl von noch zumeist unbekannten Faktoren aus dem Gehirn und dem glandulären Teil der CC reguliert so Wachstum, Differenzierung und Häutung, homöostatische Prozesse und Induktion verschiedener Verhaltensabläufe (Goldsworthy und Mordue, 1974). Neurosekretorisches Material, das sich mit den beschriebenen Methoden anfärben läßt, ist im Gehirn von Tieren, denen Azadirachtin injiziert worden war, in größeren Mengen histologisch nachweisbar als in unbehandelten Kontrollen. Dies erklärt die Hemmung der Ecysteroidsynthese in Follikelzellen von adulten Weibchen, deren Synthese durch einen Faktor aus dem PI, dem FCTH (Follikelzellen-stimulierendes Hormon), induziert wird (Hoffmann et al., 1980). Die ungewöhnlich große Ansammlung von Neurosekret in den Axonen der MNSC und im CC wird als Stau von induzierenden Faktoren interpretiert, welche nicht mehr oder in nicht ausreichender Menge in die Hämolymphe abgegeben werden können. Dies

trifft ebenso auf Neurosekret anderer Bereiche des Zentralnervensystems zu. Die auffallend starke Anfärbbarkeit von zwei ventral gelegenen Zellen des Suboesophagalganglions in manchen Larven nach Azadirachtin-Injektion (Abb. 41) kann aufgrund ihrer postulierten Funktion (Rémy und Girardie, 1980; Proux und Rougon-Rapuzzi, 1980) mit beobachteten Diuresest  rungen in Zusammenhang gebracht werden. Neurosekretorisches Material dieser zwei Zellen wirkt direkt auf die Malphigischen Gefäße, seine Ausschüttung wird multihormonal über die MNSC und MSO-NSC (subocellare mediane neurosekretorische Zellen) gesteuert. Die Störung führt zur Verringerung der H  molympfvolumina, was zum vollkommenen "Austrocknen" der Tiere führen kann. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß der aktive Transport von Neurosekret über die Membran der Neuroh  malorgane durch Azadirachtin blockiert oder verringert wird.

6. Umsteuerung und Differenzierungsprozesse

Azadirachtin schaltet jedoch nicht die Funktionsfähigkeit von induzierenden Faktoren aus, hemmt auch nicht irreversibel die Syntheseleistung von Drüsengewebe. Eindrucksvoll konnte dies durch Induktion von JH-abhängiger Vitellogeninsynthese in Larven des vierten und fünften Stadiums gezeigt werden (vgl. S. 84), denen Azadirachtin injiziert worden war. Dieses überraschende Ergebnis wirft neue Probleme auf. Vitellogenin ist ein stadienspezifisches Protein, das bei L. migratoria auf das adulte Stadium beschränkt bleibt. JH, das die Vitellogeninsynthese in adulten Weibchen induziert, steuert in der Larvalzeit Prozesse der Häutung. Azadirachtin veranlaßt auf noch unbekann-

te Weise den Fettkörper, für JH kompetent zu werden und Vitellogenin zu synthetisieren. Ebenso läßt sich mit dem JH-Analog Methopren (ZR 512) in Larven des fünften Stadiums Vitellogenin drei Tage nach der Applikation nachweisen (Dhalla und Wyatt, 1981). Jedoch ist die Menge an Methopren, die benötigt wird, um 50 % Effekt bei Larven hervorzurufen, etwa sechs mal so hoch wie bei allatektomierten Weibchen. Die Empfindlichkeit des Fettkörpers auf Methopren ist nach diesen Autoren in der Mitte des fünften Larvalstadiums am höchsten und sinkt vor der Larven- Adulthäutung auf Null. Die ungewöhnlich hohe Vitellogenin-Konzentration in der Hämolymphe, mehr als 50 Tage nach der Azadirachtin-Injektion, läßt sehr hohe JH-Konzentrationen und damit eine stark erhöhte Syntheseaktivität der larvalen CA erwarten, die über mehrere Tage anhält. Während kein erkennbarer Einbau von Vitellogenin in das Ovar behandelter Larven mit elektrophoretischen Methoden gefunden werden konnte, war eine ausgeprägte Differenzierung und Wachstum des Ovars bereits im vierten Larvalstadium nach Azadirachtin-Injektion erkennbar. Histologisch war das vergrößerte Follikelepithel länglicher Zellen und der Einbau von Schollenmaterial und tropfenförmiger Einschlüsse in das Oozytenlumen zu erkennen, während im larvalen Kontrollovar und in Ovarien adulter Kontrollweibchen nach der Häutung die Follikelzellen noch klein und undifferenziert sind (Abb. 48). Jedoch deutet die unregelmäßige Ausbildung der Follikelzellen und ihr unterschiedlicher Differenzierungsgrad innerhalb des Epithels des selben Follikels auf eine schwer gestörte Eireifung hin.

7. Der Wirkungsmechanismus des Azadirachtins

Faßt man die bisher beschriebenen und diskutierten Einzelergebnisse zusammen, so wird am Beispiel von L. migratoria deutlich, wie Azadirachtin auf den Organismus einwirkt. Es beeinflusst die Steuerung von Entwicklungsprozessen durch eine Hemmung der Ausschüttung von neurosekretorischen Induktionsfaktoren. Die Hemmung beruht nicht auf einer irreversiblen Schädigung von Neurohämälorganen. Der zeitliche Ablauf und das fein abgestimmte Programm der endokrinen Induktion, das durch unterschiedliche Parameter reguliert werden kann, wird durch Azadirachtin gestört. So ist zwar der Ablauf der Kutikulogenese von der Höhe der Ecdysteroid-Konzentration abhängig, Ecdyson steuert jedoch über den Titerverlauf andere Hormone (EH, Bursicon), die wiederum voneinander abhängig sind. In der Hämolymphe zirkulierende Hormone sind aber nur dann in der Lage, auf Zielorgane einzuwirken, wenn diese vorher ihre Kompetenz erlangt haben. Ausschüttung zum falschen Zeitpunkt löst keine oder (bei multimodalen Hormonen) neue, stadienfremde Differenzierungen aus. Die Kompetenz der Rezeptororgane kann unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterworfen sein.

Bedingt durch die Komplexität der Kontrollmechanismen konnten innerhalb dieser Arbeit viele Aspekte nicht berücksichtigt werden. So wurde nicht untersucht, ob Azadirachtin auf den Metabolismus von Hormonen, auf Enzyme oder auf Hormonrezeptoren inhibierend einwirkt. Es gelang aber erstmals, durch Injektion von Azadirachtin Entwicklungsprozesse in vivo iso-

liert zu hemmen, andere zu induzieren und sie aus ihrem Entwicklungsprogramm herauszulösen. Damit steht ein biologisches System zur Verfügung, mit dem Fragen der Kompetenz von Organen, Synthese und Einbau von Substanzen, Korrelation von induzierendem Faktor und seiner morphologischen Ausprägung untersucht werden können. Aufgrund seiner hier beschriebenen Wirkungen gestattet die Anwendung von Azadirachtin einen Einblick in Prozesse, die bislang wegen ihrer Komplexität nicht untersucht werden konnten.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Azadirachtin hemmt Entwicklungsvorgänge bei Insekten, vor allem die Metamorphose und die Eientwicklung. Charakteristisch für seine Dosis-Wirkungsbeziehung bei Locusta migratoria ist die rasche Zunahme von Häutungs- und Eireifungsstörungen. Die ED_{50} wurde mit $1,2 \mu\text{g}$ Azadirachtin/g Tiergewicht bestimmt.

Azadirachtin wirkt in allen Entwicklungsstadien nach Injektion fraßhemmend. Die reduzierte Nahrungsaufnahme ist nicht die primäre Ursache für die auftretenden Häutungsstörungen. Azadirachtin stört die endokrine Kontrolle der Häutung. Bei Larven mit fehlerhafter Kutikulogenese ist der Ecdysteroid-Titerverlauf gestört; eine vollständige Häutungshemmung ist auf eine unzureichende Ecdysteroidkonzentration zurückzuführen.

Azadirachtin hemmt nicht nur die Ecdysonsynthese, sondern auch andere, die Häutung kontrollierende Faktoren, erkennbar an Häutungsstörungen trotz erfolgter Bildung einer Kutikula und an adulten Merkmalen in Larven. Der Befund, daß auch solche Prozesse gehemmt werden, die nicht der Kontrolle durch Ecdyson unterworfen sind, wird mit einer Interaktion des Azadirachtins und übergeordneten neurosekretorischen Zentren erklärt. Azadirachtin kann n a c h der Ausschüttung von Neurosekret, aber v o r der Synthese von peripheren Hormonen (Ecdyson) Folgeprozesse nicht mehr hemmen.

Im adulten Weibchen greift Azadirachtin auf die selbe Weise wie bei Larven in hormonell gesteuerte Prozesse (Eireifung) hemmend ein. Im Gegensatz zum Larvalstadium gewinnt die fraßhemmende Wirkung des Azadirachtins bei adulten Weibchen an Bedeutung, da die Eireifungsprozesse große Mengen Eidotterproteine benötigen, die bei fehlender Nahrungsaufnahme nicht mehr synthetisiert werden können. Auch bei der Eireifung zeigt sich, daß endokrin gesteuerte Syntheseprozesse von Azadirachtin selektiv gehemmt werden. Die Ecdysteroid-Konzentration ist in Oozyten von Weibchen, denen Azadirachtin injiziert wurde, am Ende der Eireifung signifikant erniedrigt.

Die durch Azadirachtin induzierten Störungen der Morphogenese lassen sich in allen Entwicklungsstadien mit induzierenden Faktoren im Gehirn korrelieren, welche histologisch als neurosekretorisches Material nachweisbar sind. Neurosekret aus Gehirnhomogenat behandelter Larven vermag die häutungshemmende Wirkung des Azadirachtins aufzuheben, wenn es in Larven injiziert wird, denen zuvor Azadirachtin appliziert wurde. Eine cytotoxische Wirkung von Azadirachtin auf Drüsengewebe wurde nicht gefunden. Hormone werden weiter synthetisiert und ausgeschüttet. Durch verspätete oder fehlerhafte Ausschüttung von induzierenden Faktoren aus dem Gehirn können stadienfremde Entwicklungsprozesse, wie z.B. Vitellogenese und Follikelzeldifferenzierung in Larven, induziert werden.

Diese Untersuchungen zeigen erstmals die Interaktion eines Wachstumshemmers mit neurosekretorischen Faktoren aus dem Gehirn, deren Ausschüttung über die Neurohämälorgane blockiert wird, ohne das endokrine Kontrollsystem vollständig außer Kraft zu setzen oder cytotoxisch zu zerstören.

VI. LITERATUR

ADAM, H. und CZIHAK, G. (1964) Arbeitsmethoden der makroskopischen und mikroskopischen Anatomie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

ASCHER, K.R.S. (1981) Some physical (solubility) properties and biological (sterilant for Epilachna varivestis females) effects of a dried methanolic Neem (Azadirachta indica) seed kernel extract. In: Proc. 1st Internat. Neem Conf. (Eds. H. Schmutterer et al.) 1980, GTZ, Eschborn, 63-74

ASHBURNER, M. (1980) Chromosomal action of ecdysone. Natura 285, 435-436

BECKER, H.J. (1962) Die Puffs der Speicheldrüsenchromosomen von Drosophila melanogaster. II. Mitteilung. Chromosoma (Berl.), 13, 341-381

BENTLEY, D., KESHISHIAN, H., SHANKLAND, M., TOROIAN-RAYMOND, A. (1979) Quantitative staging of embryonic development of the grasshopper, Schistocerca nitens. J. Embryol. exp. Morph. 54, 47-74

BLANEY, W.M., WINSTANTLEY, C., (1980) Chemosensory mechanisms of locusts in relation to feeding: the role of some secondary plant compounds. In: Insect neurobiology and pesticide action (Neurotox '79) Society of Chemical Industry, London, 383-389

BORST, D.W., O'CONNOR, J. (1974) Trace analysis of ecdysones by gas-liquid chromatography, radioimmunoassay and bioassay. Steroids 24, 637-656

BOWERS, W.S. (1981) How anti-juvenile hormones work. Amer. Zool. 21, 737-742

BOWERS, W.S., OTHA, T., CLEERE, J.H., MARSELLA, P.A. (1976) Discovery of insect anti-juvenile hormones in plants. Science 193, 542-547

BROOKS, G.T. (1976) Penetration and distribution of insecticides. In: Insecticide Biochemistry and Physiology (Ed. Wilkinsen), Plenum Press, New York and London. 1, 3-58

BUTENANDT, A., KARLSON, P. (1954) Über die Isolierung eines Metamorphosehormons der Insekten in kristallisierter Form. Z. Naturforsch. 9 b, 389-391

BUTTERWORTH, J.H., MORGAN, E.D. (1968) Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. Chem. Comm. 23-24

BUTTERWORTH, J.H., MORGAN, E.D. (1971) Investigation of the locust feeding inhibition of the seeds of the neem tree, Azadirachta indica. J. Insect Physiol. 17, 969-977

CARUELLE, J.P., CARUELLE, D. (1978) Action in vitro des glandes de mue et de l'ecdystérone sur le compartement du tégument larvaire de Schistocerca gregaria Forsk., insecte orthopteroïde. C. R. Acad. Sci. Paris D 286, 969-972

CHEN, T.T., COUBLE, P., DE LUCCA, F.-L., WYATT, R.G. (1976) Juvenile hormone control of vitellogenin synthesis in Locusta migratoria. In: The Juvenile Hormones (Ed. L.I. Gilbert), Plenum Press, New York and London. 5, 505-529

CLEVER, U., KARLSON, P. (1960) Induktion von Puff-Veränderungen in Speicheldrüsen von Chironimus tenans durch Ecdyson. Exp. Cell Res. 20, 623-626

DAHM, K.H., TROST, B.M., RÖLLER, H. (1967) The juvenile hormone. V. Synthesis of the racemic juvenile hormone. J. Amer. chem. Soc. 89, 5292-5294

DAVEY, K.G. (1981) Regulation of cell volume in follicle cells of Rhodnius by JH. In: Juvenile Hormone Biochemistry (Eds. G.E. Pratt und G.T. Brooks), Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, 233-240

DHADIALLA, T.S., WYATT, G.R. (1981) Competence for juvenile hormone-stimulated vitellogenin synthesis in the fat body of female and male Locusta migratoria. In: Juvenile Hormone Biochemistry (G.E. Pratt und G.T. Brooks, Eds.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 257-262

FERENZ, H.-J. (1972) Pflanzliches Insektizid. Naturw. Rundschau 25, (11) 445

FERENZ, H.-J. (1978) Uptake of vitellogenin into developing oocytes of Locusta migratoria. J. Insect Physiol. 24, 237-278

FRY, J.S. und SONS (1938) Neem leaves as an insecticide. Gold coast Farmer 6, (10) 190

GAINES, T.B. (1969) Acute toxicity of pesticides. Toxicol. Appl. Pharmacol. 14, 515

GELLISSEN, G. und EMMERICH, H. (1978) Changes in the titer of vitellogenin and of diglyceride carrier lipoprotein in the blood of adult Locusta migratoria. J. Insect Physiol. 8, 403-412

GERSCH, M. und BRÄUER, R. (1974) In vitro - Stimulation der Prothoraxdrüsen von Insekten als Testsystem (Prothorakaldrüsentest). J. Insect Physiol. 20, 735-741

GILBERT, L.I. (1964) Physiology of growth and development. Endocrine aspects. In: The Physiology of Insects, (Ed. M. Rockstein) Academic Press, New York and London,

GIRARDIE, A. und DE REGGI, M. (1978) Moulting and ecdysone release in response to electrical stimulation of protocerebral neurosecretory cells in Locusta migratoria. J. Insect Physiol. 24, 797-802

GLASS, H., EMMERICH, H., SPINDLER, K.-D. (1978) Immunohistochemical localisation of ecdysteroids in the follicular epithelium of locust oocytes. Cell Tiss. Res. 194, 237-244

GOLDSWORTHY, G.J. und MORDUE, W. (1974) Neurosecretory hormones in insects. J. Endocrinol. 60, 528-529

GOLTZENE, F., LAGUEUX, M., CHARLET, M., HOFFMANN, J.A. (1978) The follicle cell epithelium of maturing oocytes of Locusta migratoria. A new biosynthetic tissue for ecdysone. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 1427-1434

HAGEDORN, H.H. und FALLON, H.M. (1973) Ovarian control of vitellogenin synthesis by the fat body in Aedes aegypti. Nature 244, 103-105

HAGEDORN, H.H., O'CONNOR, J.D., FUCHS, M.S., SAGE, B., SCHLAEGER, D.A., BOHM, M.K. (1975) The ovary as a source of α -ecdysone in an adult mosquito. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3255-3259

HARRY, P., PINES, M., APPLEBAUM, S. (1979) Changes in the pattern of secretion of locust female diglyceride-carrying lipoprotein and vitellogenin by the fat body in vitro during oocyte development. Comp. Biochem. Physiol. 63 b, 287-293

HIGHNAM, K.C. (1968) Neurosecretions in insects. Int. Congr. Progr. in Entomol. 184, 351-355

HOLLINGWORTH, G.T. (1976) The biochemical and physiological basis of selective toxicity. In: Insecticide Biochemistry and Physiology (Ed. Wilkinsen), Plenum Press, New York and London 12, 431-506

HOFFMANN, J.A., LAGUEUX, M., HETRU, C., CHARLET, M., GOLTZENE, F. (1980) Ecdysone in reproductively competent female adults and in embryos of insects. In: Progress in Ecdysone Research Developments in Endocrinology (Ed. J.A. Hoffmann), Elsevier/North-Holland 7, 431-465

HUGHES, T.D. (1980 a) The imaginal ecdysis of the desert locust, Schistocerca gregaria. I. A description of the behaviour. Physiol. Entomol. 5, 47-54

HUGHES, T.D. (1980 b) The imaginal ecdysis of the desert locust, Schistocerca gregaria. III. Motor activity underlying the expansional and postexpansional behaviour. Physiol. Entomol. 5

INYEAN, H.S. und TOBE, S.S. (1981) Phase polymorphism in Schistocerca gregaria: assessment of juvenile hormone synthesis in relation to vitellogenesis. J. Insect Physiol. 27, 203-210

JACOBSON, M. (1981) Isolation and identification of insect antifeedants and growth inhibitors from plants: an overview. In: Natural Pesticides from the Neem Tree (Azadirachta Indica A. Juss) (Eds. H. Schmutterer et al.), GTZ, Eschborn, 13-19

JOHNSON, R.A. und HILL, L. (1975) Activity of the corpora allata in the adult female migratory locust. J. Insect Physiol. 21, (8), 1517-1519

JOLY, L., GOLTZENE, F., PORTE, A. (1978) L'action exercée par l'appareil endocrine sur les phases tardives de l'ovogenese chez Locusta migratoria. J. Insect Physiol. 24, 187

KARLSON, P. (1956) Biochemical studies on insect hormones. Vitamines and Hormones 14, 227-266

KOPEC, S. (1917) Experiments on metamorphosis of insects. Bull. Int. Acad. Sci. (Cracovie) B 57-60

KOPEC, S. (1922) Studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis. Biol. Bull. Woods Hole 42, 323-343

LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. Nature 227, 680-685

LAGUEUX, M. HIRN, M., HOFFMANN, J.A. (1977) Ecdysone during ovarian development in Locusta migratoria. J. Insect Physiol. 23, 109-119

LANZREIN, B., HASHIMOTO, M., PARMAKOVICH, V., NAKANISHI, K., WILHELM, R., LÜSCHER, M. (1975) Identification and quantification of juvenile hormones from different developmental stages of the cockroach Nauphoeta cinera. Life Sciences 16, 1271-1284

LIM, S.J. und LEE, S.S. (1981) The effect of starvation on haemolymph metabolites, fat body and ovarian development in Oxya japonica (Acrididae: Orthoptera). J. Insect Physiol. 27, 93-96

- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 365-375
- MARKS, E.P. und HOLMAN, G.M. (1979) Ecdysone action on insect cell lines. In Vitro 15, (4), 300-307
- MC CAFFERY, A.R. (1976) Effects of electrocoagulation of cerebral neurosecretory cells and implantation of corpora allata on oocyte development in Locusta migratoria. J. Insect Physiol. 22, 1081-1092
- MWANGI, R.W. und GOLDSWORTHY, G.J. (1980) The effect of allatectomy and ovariectomy on haemolymph proteins and lipid mobilisation in Locusta. J. Insect Physiol. 26, 741-747
- PENER, M.P., ORSHAN, L., DE WILDE, J. (1978) Precocene II causes atrophy of corpora allata in Locusta migratoria. Nature 272, (5651), 350-353
- PROUX, J und ROUGON-RAPUZZI, G. (1980) Evidence for vasopressin-like molecules in migratory locust. Radioimmunological measurements in different tissues: correlation with various states of hydration. Gen. Comp. Endocrinol. 42, 378-383
- REMY, C. und GIRARDIE, J. (1980) Anatomical organisation of two vasopressin - neurophysin-like neurosecretory cells throughout the central nervous system of the migratory locust. Gen. Comp. Endocrinol. 40, 27-35
- REMBOLD, H., SHARMA, G.K., CZOPPELT, C., SCHMUTTERER, H. (1980) Evidence of growth disruption in insects without feeding inhibition by neem seed fractions. Z. PflKrankh. PflSchutz 87, 290-297
- REMBOLD, H. und SCHMUTTERER, H. (1981) Disruption of insect growth by neem seed compounds. In: Regulation of Insect Development and Behaviour (Ed. F. Sehnal) Wroclaw Techn. University Press, Poland, 13, 1087-1090
- REMBOLD, H., EDER, J., ULRICH, G.M. (1980) Inhibition of allatotrophic activity and ovary development in Locusta migratoria by anti-brain-antibodies. Z. Naturforsch. 35 c, 1117-1119

REMBOLD, H., und SIEBER, K.-P. (1981) Inhibition of oogenesis and ovarian ecdysteroid synthesis by Azadirachtin in Locusta migratoria migratoroides (R & F). Z. Naturforsch. 36 c, 466-469

REUM, L. und KOOLMANN, J. (1979) Analysis of ecdysteroids by radioimmunoassay: comparison of three different antisera. Insect Biochem. 9, 135-142

RIDDIFORD, L.M., (1978) Ecdysone-induced change in cellular commitment of the epidermis of the tobacco hornworm, Manduca sexta, at the initiation of metamorphosis. Gen. Comp. Endocrinol. 34, 438-446

RÖLLER, H., DAHM, K.H., SWEELEY, C.C., TROST, B.M. (1967). The structure of juvenile hormone. Angew. Chemie. Internat. edition in english 6, 179-180

RÖLLER, H. und DAHM, K.H. (1968) Chemistry of juvenile hormones. In: Recent Progress in Hormone Research (Ed. E.B. Astwood), Academic Press, New York and London, 24, 651-680

ROMEIS, B. (1968) Mikroskopische Technik. R. Oldenbourg Verlag, München-Wien.

RUSCOE, C.N.E. (1972) Growth-disruption effects of an insect antifeedant. Nature 236, 159-160

SCHMUTTERER, H., ASCHER, S., REMBOLD, H. (1981) Natural Pesticides from the Neem tree (Azadirachta indica A. Juss). Proc. 1st Internat. Neem Conf., GTZ, Eschborn

SCHMUTTERER, H. und REMBOLD, H. (1980) Zur Wirkung einiger Reinfractionen aus Samen von Azadirachta indica auf Fraßaktivität und Metamorphose von Epilachna varivestis (Col. Coccinellidae). Z. angew. Entomol. 2, 179-188

SEKERIS, H. und KARLSON, P. (1966) Biosynthesis of catecholamines in insects. Pharmac. Rev. 18, 89-94

SPINDLER, K.D., BECKERS, C., GRÖSCHEL-STEWART, U., EMMERICH, H. (1978) A radioimmunoassay for arthropod molting hormones, introducing a novel method of immunogen coupling. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 1269-1275

STEETS, R. und SCHMUTTERER, H. (1975) Einfluß von Azadirachtin auf die Lebensdauer und das Reproduktionsvermögen von Epilachna varivestis Muls. (Coleoptera, Coccinellidae). Z. Pflkrankh. Pflschutz 82, 176-179

STEETS, R. (1976) Zur Wirkung eines gereinigten Extraktes aus Früchten von Azadirachta indica A. Juss auf Leptinotarsa decemlineata Say (Coleoptera, Chrysomelidae). Z. angew. Entomol. 82, 169-176

STEETS, R. (1976) Zur Wirkung von Inhaltsstoffen aus Meliaceen und Anacardiaceen auf Coleopteren und Lepidopteren. Dissertation, Universität Giessen.

TOBE, S.S. (1980) Regulation of the corpora allata in adult female insects. In: Insect Biology in the Future. "VBW 80" (Eds. M. Locke und D.S. Smith), Academic Press, New York and London, 345- 367

TOBE, S.S., CHAPMAN, C.S., PRATT, G.E. (1977) Decay in juvenile hormone biosynthesis by insect corpus allatum after nerve transection. Nature 268, 728-730

TOBE, S.S. und STAY, B. (1980) Control of juvenile hormone biosynthesis during the reproductive cycle of a viviparous cockroach (Diploptera punctata). Gen. Comp. Endocrinol. 40, 89-98

TRUMAN, J.W., TAGHERT, P.H., COPENHAVER, P.F., TUBLITZ, N.J., SCHWARTZ, L.M. (1981 c) Eclosion hormone may control all ecdyses in insects. Nature 291, 70-71

ULRICH, G.M. (1976) Untersuchungen zur Morphologie der Produktion und Leitung von Neurosekret und seiner Wirkung auf die Ovarentwicklung bei Locusta migratoria migratoroides (R & F). Diplomarbeit, Universität Köln

VINCENT, J.F.V. (1971) Effects of Bursicon on cuticular properties in Locusta migratoria migratoroides. J. Insect Physiol. 17, 625-636

VOLKONSKY, M. (1937) Sur un procédé nouveau de protection des cultures contre les acridiens. C. R. Soc. Biol. Paris 125, 417-418

WIELGUS, J.J., BOLLENBACHER, W.E., GILBERT, L.I. (1979) Correlations between epidermal DNA synthesis and hemolymph ecdysteroid titres during the last larval instar of the tobacco hornworm, Manduca sexta. J. Insect Physiol. 25, 9-16

WIGGLESWORTH, V.B. (1934) The physiology of ecdysis in Rhodnius prolixus (Hemiptera) III: Factors controlling moulting and "metamorphosis". Quart. J. Micr. Sci. 77, 191-222

WIGGLESWORTH, V.B. (1940) The determination of characters at metamorphosis in Rhodnius prolixus (Hemiptera). J. Exp. Biol. 17, 201-222

WIGGLESWORTH, V.B. (1964) Hormonal control of growth and reproduction in insects: review. Adv. Insect Physiol. 2, 247 - 336

WILLIAMS, C.M. (1947) Physiology of insect diapause. II. Interaction between the pupal brain and prothoracic glands in the metamorphosis of the giant silkworm, Platysamia cecropia. Biol. Bull. Woods Hole 93, 89-98

YUND, M.A., KING, D.S., FRISTOM, J.W. (1978) Ecdysteroid receptors in imaginal discs of Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 6039-6043

ZANNO, P.R., MIURA, I., NAKANISHI, K., ELDER, D.L. (1975) Structure of the insect phagorepellent azadirachtin. Applications of PRFT/CWD carbon-13 nuclear magnetic resonance. J. Am. Chem. Soc. 97, 1975-1977

VII. LEBENSLAUF

Am 25. Dezember 1951 wurde ich, Klaus-Peter Sieber, als Sohn des Realschullehrers Andreas Sieber und seiner Ehefrau Margarethe, geb. Serve, in Backnang geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule und des Gymnasiums legte ich 1970 das Abitur ab. Nach einem einjährigen Aufenthalt in den Vereinigten Staaten von Amerika begann ich 1971 das Studium der Biologie und Chemie für das höhere Lehrfach an der Universität Tübingen, das nach der Zwischenprüfung 1973 an der Universität Freiburg im Brsg. fortgeführt wurde. Dort legte ich am 26. Juli 1978 das Staatsexamen ab.

Im März 1979 begann ich unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Rembold am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, meine hier vorliegende Dissertation, die ich im Juni 1982 abschloß.

